

Aus der 2. Inneren Abteilung der Städtischen
Krankenanstalten Berlin-Neukölln
Dirigierende Ärztin: Prof. Dr. med. I. Boll

DIE EINWIRKUNG VON
HYDROXYUREA AUF DIE
PROLIFERATION VON
NORMALEN UND LEUKÄMISCHEN
MENSCHLICHEN
KNOCHENMARKZELLEN IN VITRO

Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Zahnarzt Peter Nachtweh
aus Meppen

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der 2. Inneren Abteilung der Städtischen
Krankenanstalten Berlin-Neukölln
Dirigierende Ärztin: Prof. Dr. med. I. Boll

DIE EINWIRKUNG VON
HYDROXYUREA AUF DIE
PROLIFERATION VON
NORMALEN UND LEUKÄMISCHEN
MENSCHLICHEN
KNOCHENMARKZELLEN IN VITRO

Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Zahnarzt Peter Nachtweh
aus Meppen

Referent : Prof. Dr. med. I. Boll

Korreferent: Prof. Dr. H.-J. Stolpmann

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Zahn-, Mund-
und Kieferheilkunde der Freien Universität Berlin



Promoviert am: 31.10.1975

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	Seite 1
Fragestellung	16
Methode	18
Statistische Auswertung	23
Ergebnisse	27
Zusammenfassung der Ergebnisse	68
Diskussion	86
Zusammenfassung	92
Literaturverzeichnis	94

Einleitung

Die chemotherapeutische Behandlung mit Zytostatika und Hormonen ist die bisher einzige wissenschaftlich belegte medikamentöse Therapie maligner Erkrankungen, die zu eindeutigen Rückbildungen solider Tumoren, zu Remissionen maligner Systemerkrankungen und zum zeitweise völligen Verschwinden leukämischer Symptome führt. Malignomzellen werden durch zytostatische Behandlung wesentlich vermindert oder scheinbar zum völligen Verschwinden gebracht. Da alle klinisch gebräuchlichen Substanzen Proliferationsgifte im weitesten Sinne sind, muß bei der praktischen Anwendung von Zytostatika mit erheblichen Nebenwirkungen gerechnet werden. Nach biologischer Wirkung und chemischer Herkunft werden die zytostatischen Chemotherapeutika folgenden sechs wichtigen Hauptgruppen zugeordnet:

1. Alkylierende Verbindungen
2. Antimetabolite
3. Onkolytische Antibiotika
4. Alkaloide
5. Hormone
6. Enzyme

Hydroxyurea gehört zur Gruppe der Antimetabolite,

außerdem Pyrimidin-, Purin-, Folsäure- und Cytidin-Antagonisten. Die Bezeichnung Antimetabolite wird von der chemischen Ähnlichkeit mit natürlichen Stoffwechselmetaboliten hergeleitet, die im Stoffwechsel kompetitiv verdrängt werden, ohne selbst die notwendigen Stoffwechselfunktionen auszuüben (17).

Die in der Behandlung von Tumoren und Leukämien eingesetzten Antimetabolite sind dadurch wirksam, daß sie verschiedene Reaktionen der Nucleotid-, insbesondere der DNS-Synthese, hemmen. In erster Linie handelt es sich um kompetitive Enzyminhibitoren, die infolge ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit physiologischen Substraten oder Co-Faktoren diese von ihren Bindungsplätzen verdrängen. Dabei ist zu berücksichtigen, daß wichtige, bei der DNS-Synthese beteiligte Enzyme nicht während des gesamten Generationszyklus in gleicher Aktivität in den proliferationsfähigen Zellen vorhanden sind, sondern in der DNS-Synthese-Phase oder unmittelbar davor neu gebildet werden. Enzyminhibitoren der DNS-Synthese können daher nur dann wirksam sein, wenn sie in genügend hoher Konzentration intrazellulär angereichert sind, um einen Enzymblock während der gesamten Dauer eines Zellzyklus zu bewirken und dadurch die proliferierenden Zellen in der DNS-Synthese letal zu schädigen. Der Nucleotidstoffwechsel proliferierender Zellen kann außerdem dadurch gestört werden,

daß bestimmte Substanzen weiter metabolisiert werden und als falsche Nucleotide in die DNS oder RNS eingebaut werden (23).

Der Ausgangspunkt einer zytostatischen Tumorthherapie mit Antimetaboliten war 1948 die Beobachtung von FARBER und Mitarbeitern, daß durch Behandlung mit dem Folsäureantagonisten Aminopterin akute Leukämien im Kindesalter erfolgreich beeinflußt werden können. Die Verbindung unterscheidet sich von der Vitaminfolsäure nur durch die Substitution einer OH-Gruppe durch eine NH_2 -Gruppe (42).

Hydroxyurea wurde 1969 von DRESLER und STEIN erstmalig synthetisiert (13). Seine inhibitorische Wirkung auf die DNS-Synthese wurde 1964 von YOUNG und HODAS an Hela-Zellen beobachtet (46). Im Vergleich zur DNS-Synthese des Zellkernes ist die Synthese zytoplasmatischer DNS durch Hydroxyurea weniger leicht hemmbar (40).

Die molekularen Mechanismen, die der Hemmung der zellulären DNS-Synthese durch Hydroxyurea sowie seiner offenbar weitgehend auf Zellen in der S-Periode des Zellzyklus beschränkten cytotoxischen Wirkung zugrundeliegen, sind noch nicht vollständig geklärt. Verschiedene Autoren haben Hinweise gefunden, daß Hydroxyurea die Umwandlung von Cytidylsäure zu Desoxycytidylsäure blockiert, und zwar durch Inhibition des Enzyms B_2 des Ribonucleotid-Reduktase-Systems. Andererseits können aber direkte Wirkungen auf die DNS nicht ausgeschlossen werden.

Es muß die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß aus Hydroxyurea unter in vivo Bedingungen einer oder mehrere Metabolite entstehen und die Substanz auf diesem Wege mit mehreren zellulären Stoffwechselprozessen interferiert. Allgemein betrachtet man Hydroxyurea als Thymidin-Antagonisten (1, 35, 45).

KRAKOFF gibt eine schematische Darstellung des Pyrimidinnucleotid-Stoffwechsels bei der DNS-Synthese, sowie der wahrscheinlichen Angriffspunkte von Hydroxyurea als Inhibitor der DNS-Synthese (21).

Bei der "de novo"-Synthese von DNS findet durch die Ribonucleosiddiphosphatreductase bei Pyrimidin- und Purin-Nucleotiden eine Reduktion zu Desoxyribosiden auf der Stufe der Diphosphate statt. Hydroxyurea interferiert mit der Ribonucleosiddiphosphatreductase, in dem es das intrazelluläre Eisen, das als Co-Faktor für dieses Enzym benötigt wird, belegt. Die Aktivität des Fermentes ist herabgesetzt.

Ribonucleosiddiphosphat

z.B. Uridindiphosphat (UDP), Cytidindiphosphat (CDP)

Herabsetzung der
Aktivität durch
Hydroxyurea



Ribonucleosiddiphosphat-
reductase

Desoxyribonucleosiddiphosphat (dUDP, dCDP)

Hydroxyurea hat die chemische Formel $\text{NH}_2\text{-CONOH}$
($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}_2$). Die Strukturformel lautet $\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{O}}{\underset{||}{\text{C}}}-\underset{\text{OH}}{\text{N}}^{\text{H}}$.

Sein Molekulargewicht beträgt 76.06 (39). Hydroxyurea ist ein weißes, geruchloses, geschmackloses, kristallines Pulver. Der Schmelzpunkt liegt bei $+143^\circ\text{C}$.

Es ist leicht löslich in Wasser und in Alkohol. Als I.N.N. (International nonproprietary names) findet man Hydroxycarbamidum, Hydroxycarbamid, Hydroxyurea (BAN, USAN = British approved name, U. S. adapted name). Die chemische Bezeichnung lautet Hydroxyharnstoff. In den U.S.A. und in England wird der verwendete Hydroxyharnstoff mit dem Handelsnamen Hydrea vom Squibb Institute for Medical Research bezogen, während in Deutschland Hydroxyurea unter dem Handelsnamen Litalir^R bekannt ist (14, 26, 29).

Nach der therapeutischen Anwendung von Hydroxyharnstoff bei verschiedenartigen Tumoren und deren Metastasen werden objektive Zeichen von Remissionen beobachtet. Auch eine palliative Wirkung bei chronischer und akuter Leukämie wird beschrieben, obwohl Busulphan und Mercaptopurin gewöhnlich bevorzugt werden. Es wird verabreicht per os als Einzeldosis von 20 bis 30 mg pro kg Körpergewicht täglich oder als einmalige Dosis von 80 mg pro kg Körpergewicht jeden dritten Tag. Die Toxizität von Hydroxyurea steht in direktem Verhältnis zur Dosismenge. Als ungewöhnliche

toxische Effekte sind verschiedenartige gastro-intestinale Störungen, in seltenen Fällen auch Hautausschläge aufgetreten. In einigen Fällen werden fragliche neurologische Symptome beobachtet.

Der wichtigste normale Effekt von Hydroxyurea ist die reversible Unterdrückung der Knochenmarkfunktion, die sich als Leukopenie und Thrombocytopenie und Anämie manifestiert. Leukozyten- und Thrombozytenzahl können, wenn die Zahl der geformten Blutelemente beträchtlich abnimmt, durch Unterbrechen der Therapie beherrscht werden, bis die Blutzellwerte zum Normalen zurückkehren. Die Behandlung sollte unterbrochen werden, wenn die Leukozytenzahl auf $3000/\text{mm}^3$ oder die Thrombozytenzahl auf $100000/\text{mm}^3$ absinkt. Eine Anämie wird am besten durch Bluttransfusion ohne Unterbrechung der Hydroxyurea-Therapie behandelt. Die Hämoglobinkonzentration, die weiße Zellzahl und die Thrombozytenzahl, die Leber- und Nierenfunktion sollten während der Anfangsphase der Behandlung wöchentlich kontrolliert werden und bei längerer Behandlungsdauer häufig wiederholt werden (27). Beim Vorliegen von Nierenneoplasmen bzw. von Metastasen oder von Nierenfunktionsstörungen anderer Ätiologie sollte Hydroxyurea nur mit Vorsicht angewandt werden. Manifeste Leukopenie, Thrombozytopenie oder schwere Anämien stellen Kontraindikationen dar. Nach Strahlentherapie

oder Anwendung anderer zytostatischer Substanzen wird zur Erholung des Knochenmarks eine Pause von mindestens drei Wochen empfohlen. Wie bei zytostatischen Substanzen zu erwarten ist, hat Hydroxyurea bei einigen Tierarten teratogene Wirkung. Dies muß in Betracht gezogen werden, wenn die Behandlung mit Hydroxyurea für Schwangere erwogen wird (12).

Hydroxyurea ist ferner kontraindiziert bei Patienten, die bei einer vorausgegangenen Behandlung eine Überempfindlichkeit gegen die Substanz zeigten. Um die Ansprechbarkeit der Neoplasmen auf die zytostatische Wirkung von Hydroxyurea beurteilen zu können, sind etwa sechs Wochen anzusetzen. Die Therapie sollte jedoch nach vier Wochen abgesetzt werden, wenn der Krankheitsprozess trotzdem noch rasch fortschreitet (18).

Hydroxyurea wird bereitwillig vom gastro-intestinalen Trakt aufgenommen und im ganzen Körper verteilt. Spitzenkonzentrationen im Serum werden in ein bis zwei Stunden erreicht. Hydroxyurea wird schnell im Urin ausgeschieden. Zum großen Teil wird es offenbar vorwiegend durch enzymatische Reduktion in der Leber in Harnstoff umgewandelt (11). Ungefähr 70 % einer hohen Dosierung werden unverändert ausgeschieden, während bei einer kleineren Dosierung vor der Ausscheidung eine Metabolisierung auftreten kann.

Über Behandlungserfolge bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML) mit Hydroxyurea findet man in der Literatur zahlreiche Aussagen:

KENNEDY und YARBRO berichten von der Heilung von neun Patienten mit CML, denen Hydroxyurea in einer täglichen Dosis von 50 mg pro kg Körpergewicht verabreicht wurde. Die Dosis wurde reduziert auf 30 mg, wenn eine Leukopenie auftrat. Die mittlere Dauer der Kontrolle betrug 17 Monate (20).

WEIL und TANZER haben 46 an CML erkrankte Patienten mit Hydroxyurea behandelt. Eine vollständige Heilung wurde bei 24 von 34 Patienten erzielt, denen Hydroxyurea das erste Mal verabreicht worden war. Bei einigen Patienten, die bereits mit Busulphan oder Daunorubicin vorbehandelt waren, erzielten sie vollständige oder teilweise Remissionen (41).

KENNEDY verabfolgte Hydroxyurea 20 Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML). Er beschreibt: Die weiße Blutzellzahl verminderte sich bei allen Patienten auf die Normalwerte, eine bestehende Anämie verbesserte sich, Splenomegalie nahm ab oder verschwand sogar, Thrombozytose wurde korrigiert, und das Knochenmark erholte sich bei allen Patienten. Megaloblastoide Zellen wurden jedoch bei allen Patienten beobachtet. Hydroxyurea war effektiv bei der Behandlung der chronischen myeloischen Leukämien, die resistent gegen Busulphan waren. Hydroxyurea verhinderte zwar nicht die Entwicklung der CML in eine akute Krankheitsphase der CML, der Hämolyse oder

Myelofibrose. Die hauptsächliche Systemreaktion waren die reversible Myelosuppression und eine ungewöhnliche Hautveränderung. Hydroxyurea konnte primär zur Behandlung der CML herangezogen werden (19).

FISHBEIN beschreibt, daß Hydroxyurea geeignet ist, bei einer Dosis von 20 bis 50 mg pro kg Körpergewicht die CML in der chronischen Phase zu beherrschen (16).

Häufig wird bei der Behandlung von Patienten mit malignen Melanomen Hydroxyurea allein nicht ausreichen. Hydroxyurea ist wirkungsvoller in Verbindung mit weiteren Medikamenten und mit Radiotherapie (10).

Eine weitere Bedeutung hat Hydroxyurea bei der Behandlung von malignen Neoplasmen erreicht. LERNER und BECKLOFF verabreichten Hydroxyurea für sechs Wochen an 25 Patienten, die an malignen Neoplasmen erkrankt waren, in einer Dosismenge von 80 mg pro kg Körpergewicht. Meistens wurde Hydroxyurea per os verabreicht, bei drei Patienten jedoch intraperitoneal. Die Hälfte von 16 Patienten, die sich der gesamten Kur unterzogen hatten, zeigten objektive Verbesserungen (24).

Die genannten Autoren behandelten maligne Neoplasmen an Kopf und Nacken von 13 Patienten mit Hydroxyurea, nachdem zuvor eine Woche lang bestrahlt worden war. Bei allen Patienten wurde eine Verkleinerung des Tumors beobachtet, und 9 Patienten waren

von der Krankheit für zwei bis dreizehn Monate klinisch frei (25).

NEVINNY und HALL behandelten 18 Patienten mit metastatischen Nierenkarzinomen. Von 14 Patienten, die mehr als eine Gesamtdosis von 5 g erhielten, zeigten fünf objektive Verbesserung dauerhaft für zwei bis fünf Monate. Nebeneffekte waren starke Knochenmarkdepression und gastrointestinale Toxizität, beides jedoch reversibel (28).

RICHARDS und CHAMBERS kombinierten bei 40 Patienten eine Hydroxyureabehandlung mit der Radiotherapie und mit chirurgischem Vorgehen. Es wurde eine vollständige Beseitigung des Tumors erreicht (34).

Inoperable Neoplasmen behandelte ARIEL bei 118 Patienten mit ca. 50 mg Hydroxyurea pro kg Körpergewicht täglich in zwei Dosen. Die beste Ansprechung trat bei malignen Melanomen, Neoplasmen des gastrointestinalen Trakts, des Kopfes und des Halses, der Leber und der Lymphknoten auf. Weniger erfolgreich war die Behandlung bei Erkrankungen der Lunge, der Prostata und der Schilddrüse (2).

YARBRO schildert die seltene Behandlung mit Hydroxyurea bei der Psoriasis, die resistent war gegenüber der konventionellen Therapie. Es trat eine Verbesserung der Hautläsion auf (43).

Bei der kombinierten Behandlungsmethode, Hydroxyurea in Verbindung mit einer Radiotherapie, spielt der sogenannte Synchronisationseffekt eine bedeutende Rolle.

Die Synchronisationstherapie beruht auf dem Konzept, möglichst viele Zellen in einer strahlenempfindlichen Zyklusphase zu akkumulieren, um mit gleicher Strahlenintensität mehr Zellen hinsichtlich ihrer Vermehrungsfähigkeit zu inaktivieren. Asynchron proliferierende Tumorzellen, die bekanntlich nur in bestimmten Teilungsphasen zytostatikaempfindlich sind, werden durch vorübergehende medikamentöse Arretierung der Mitosen in ein gleiches Entwicklungsstadium gebracht. Dies gelingt z. B. durch kleine nicht zellvernichtende Dosen von Vincristin. Vincristin ist wie Colchizin ein Mitoseblocker. DNS-Synthesehemmer sind Cytosinarabinosid, Hydroxyurea und Daunomycin. Dem Hydroxyurea in der Wirkung ähnlich sind Busulphan, Mitobromitol, Demecolcine und Pipsulfan. Nur die Tumorzellen, die sich gerade in der Mitose befinden, entwickeln sich unter Vincristin nicht weiter, während die übrigen in einem anderen Zyklusabschnitt befindlichen Zellen zunächst unbehindert weiter proliferieren, um dann ebenfalls unter Einwirkung des Metaphasenblockes Vincristin in der nächsten Mitosephase steckenzubleiben.

Nach Abklingen der Vincristineinwirkung tritt die vorher asynchron proliferierende Zellpopulation in ein gleiches, d. h. synchronisiertes Stadium der

Entwicklung ein. Die Anreicherung von Tumorzellen in der gleichen Phase des Generationszyklus führt dazu, daß durch nachfolgend applizierte Zytostatika mit spezifischer bzw. maximaler Hemmwirkung auf proliferierende Zellen in bestimmten Zellteilungsphasen eine größere Anzahl von Malignenzellen zytostatisch beeinflusst wird als im Falle der asynchron wachsenden Zellpopulation (9).

RAJEWSKY ist die temporäre Inhibition der DNS-Synthese durch Hydroxyurea in normalem und malignem Säugerzellsystem in vivo gelungen. Die temporäre Blockade der DNS-Synthese mit Hydroxyharnstoff hat er an verschiedenen Geweben wie Embryo, Leber, Milz und transplantablen BICR/MIR - Tumoren der Ratte durchgeführt. Hydroxyurea inhibiert die DNS-Synthese in vivo spezifisch, rasch und nahezu vollständig. Die zur Inhibitorwirkung benötigten Konzentrationen von Hydroxyurea konnten im Blut mit Hilfe des ³H-Thymidineinbaus durch Inkubation entsprechender Blutplasmaproben mit Referenzzellen in vitro bestimmt werden. RAJEWSKYS Ergebnisse zeigen, daß durch Anwendung eines Inhibitors der DNS-Synthese vom Typ des Hydroxyurea unter kontrollierten Bedingungen eine partielle Synchronisation proliferierender Zellen in vivo erreicht werden kann. Weiter beschäftigte ihn die Frage, ob bei Säugerzellen als Funktion ihrer Position im Zellzyklus Empfindlichkeitsunterschiede vorhanden sind, und zwar sowohl

für die Auslösbarkeit des Prozesses der malignen Transformation durch cancerogene Faktoren als auch für die Inaktivierbarkeit maligner Zellen durch cytocide Agentien oder ionisierende Strahlen (30, 33).

Zytotoxische Wirkungen großer Hydroxyureaddosen auf Zelltypen mit hohen Proliferationsraten (Kryptenepithelien des Dünndarms, Knochenmark, Thymus, Milz und Lymphknoten) sind ebenfalls beschrieben worden (15, 31).

Ausdrücklich ist die außerordentlich hohe Empfindlichkeit (unsterblicher Zelllinien) der chronisch bereits durch kontinuierliche Hydroxyureabehandlung irreversibel geschädigt werden können (30).

KUMMEROW untersuchte die Strahlenwirkung auf ein transplantiertes Fibrosarcom der Ly-Maus nach Totalsynchronisation mit Hydroxyarnstoff. Das Sarkom wurde mit Hydroxyarnstoff in vivo synchronisiert und anschließend alternativ am G₁ - S-Übergang oder in der mittleren S-Phase mit 1200 R bestrahlt. Die erzielte Wachstumverzögerung erwies sich dabei als Überlegenheit von geschulten Leukocyten der Bestrahlung. In keinem Falle war die Wirkung der konditionierten Gefäßung der einfachen Behandlung deutlich überlegen. Mit Hydroxyarnstoff behandelte Tumoren reagierten darüber hinaus in den ersten Tagen nach Bestrahlung

mit einer starken Volumenregression, die bei den nur bestrahlten Tumoren nicht beobachtet wurde. Die Ergebnisse zeigen, daß eine Hydroxyharnstoff-Vorbehandlung erfolgversprechend ist (22).

SCHWARZENBERG hat 1965 gezeigt, daß Transfusionen mit CML-Zellen physiologisch aktive Leukozyten enthalten, die Agranulocytose heilen können. Es erhob sich die Frage, ob Leukopherese dem Patienten mit CML schadete. Die einzige Möglichkeit, um genügend CML-Zellen für eine Transfusion zu erhalten, war, die CML mit Hydroxyurea zu behandeln, so daß sich ein großer Leukozytenzahlanstieg entwickelte, wenn Hydroxyurea wieder abgesetzt wurde (36, 37).

Ein Team von BOHNE, HAAS, FLIEDNER u.a. hatte den Effekt von Hydroxyurea am Knochenmark untersucht, und zwar besonders an den ruhenden Stellen des Knochenmarks von Ratten, die vorher mit ³H-Thymidin gekennzeichnet waren. Tiere, die viermal 500 mg Hydroxyurea pro kg Körpergewicht im Sechsstunden-Intervall erhalten hatten, zeigten eine Zerstörung aller proliferierenden Zellen des Knochenmarks. Eine Regeneration begann vier Tage nach der letzten Hydroxyurea-Behandlung und war erst zehn Tage später abgeschlossen. Zur Zeit der schwersten Destruktion nach Verabreichung aller Einzeldosen wurden nie hämopoetische Zellen entdeckt. In den ersten Tagen der Behandlung zeigte sich eine signifikante Anzahl

von karyolytischen und pyknotischen Zellen, vielkernigen Zellen und Riesenzellen. Mitosen wurden in ansteigender Zahl während der Regenerationszeit beobachtet (4).

Fragestellung

Hydroxyurea ist ein Zytostatikum, das zur Behandlung der CML, von malignen Melanomen und Neoplasmen Anwendung findet (2, 10, 16, 20, 24, 25, 28, 34, 41).

Die Einwirkung von Hydroxyurea auf die leukämischen Zellen der Granulopoese des Knochenmarks und auf Tumoren wurden bisher nur tierexperimentell untersucht. Die dabei gesammelten Erfahrungen wurden therapeutisch für den Menschen ausgewertet (4, 15, 22, 36, 38, 44). Die Untersuchungen beinhalten keine Aussage über die direkte Wirkung von Hydroxyurea auf die menschlichen Knochenmarkszellen.

In dieser Arbeit soll der Effekt von Hydroxyurea auf menschliches Knochenmark ohne Beeinflussung durch nervale und humorale Faktoren, also in vitro, untersucht werden. Da bei einer zytostatischen Behandlung besonders die normalen Effekte, wie die reversible Knochenmarkdepression mit Leukopenie, Thrombozytopenie und Anämie auftreten können, kann eine Unterbrechung der Therapie zwingend erforderlich werden (18).

In dieser Phase der Unterbrechung wird jedoch die gerade erreichte Wachstumsverzögerung eines Tumors

einer erneuten Proliferationsaktivität weichen. Bei der Behandlung der CML bewirkt die erzwungene Absetzung einen entsprechend stärkeren Anstieg der Leukozytenzahl während der Erholungsphase des Knochenmarks (4).

Um das tatsächliche Geschehen im Knochenmark beurteilen zu können, werden die Reifung und die Regeneration der Knochenmarkzellen an Hand von Reifungskurven, Mitoseindices, G/E-Indices und karyologischen Kurven im Vergleich mit parallel angelegten Knochenmarkkulturen ohne medikamentösen Zusatz beurteilt. Die gewählte Dosierung wird an die aus der Literatur angegebenen therapeutischen Dosierungen angelehnt (16). Unseren Kulturen wurden Zusätze der Konzentrationen 10 μ /ml bei drei Patienten und 60 μ /ml bei zwei weiteren dem Kulturmedium beigelegt.

Methode

Die Knochenmarkkulturen werden nach der Technik von CARREL und der von BOLL modifizierten Methode angelegt (5). Als Material stehen Knochenmarkpunktate von fünf Patienten zur Verfügung. Unter sterilen Bedingungen wird ein Medium aus fünf Tropfen Eigenplasma, drei Tropfen Eigenserum, einem Tropfen Corhormon^R, dreifach verstärkt, und einem Tropfen Hydroxyurea-Lösung (Endkonzentration 10 μ /ml oder 60 μ /ml) hergestellt, das auf einen Objektträger gebracht, zum Koagulum gerinnt. Auf dieses Koagulum wird ein Knochenmarkbröckchen vom Sternalpunktat gesetzt und anschließend mit einem Serumtröpfchen bedeckt, um das Austrocknen der Zellen zu verhindern. Die Kultur wird mit einem Hohlschliffträger und Paraffin luftdicht verschlossen. Die Inkubation erfolgt im Brutschrank bei +37°C. Von jedem Sternalpunktat werden ein Originalausstrich, eine Serie von Kontrollkulturen und eine von Kulturen mit Zusätzen von Hydroxyurea angefertigt. Die Kontrollkultur wird mit fünf Tropfen Eigenplasma, vier Tropfen Eigenserum und einem Tropfen Corhormon^R, dreifach verstärkt, angesetzt.

Nach Abschluß der Bebrütungszeit werden Ausstriche angefertigt, luftgetrocknet und nach der Methode

von PAPPENHEIM gefärbt. Von jedem Präparat werden ungefähr 2000 Zellen in den lockeren Randgebieten des Ausstriches ausgezählt. Gewertet werden außerdem die beobachteten Mitosephasen.

Die Versuchsreihe wird begonnen mit einer Endkonzentration des Hydroxyurea von 60 μ /ml, angesetzt für zwei Patienten. Nachdem bei dieser Konzentrationswahl ein Effekt erkennbar ist, wird für die weiteren Versuchsreihen die Endkonzentration auf 10 μ /ml herabgesetzt. Die Bebrütungsdauer ist im wesentlichen festgelegt auf den Zeitraum 24 h, 48 h, 72 h. Bei drei Versuchen wird zusätzlich nach 12 Stunden Bebrütungsdauer ein Ausstrich angefertigt. In einem Fall kann die Kultivierungszeit statt nach 72 Stunden erst nach 96 Stunden beendet werden.

Im Präparat erfolgt die Differenzierung der einzelnen Zellen des Knochenmarks auf folgende Weise (nach BOLL):

1. Man unterscheidet bei der Erythropoese (8):
 - a) Proerythroblasten
 - b) basophile Erythroblasten
 - c) polychromatischer Erythroblasten
 - d) orthochromatische Erythroblasten
 - e) reife Erythroblasten
2. Folgende Zellen gehören zum retikulo-endothelialen System:
 - a) Plasmazellen
 - b) Plasmoblasten

- c) Retikulumzellen
 - d) Phagocytierende Retikulumzellen
3. Megakaryocyten
4. Zu dem monocytären System gehören:
- a) Promonocyten
 - b) Monozyten
5. Zum lymphatischen System rechnet man:
- a) Lymphozyten
 - b) Lymphoblasten
6. Bei der Granulocytopoese wird unterschieden zwischen (5):
- a) Myeloblasten
 - b) Promyelozyten
 - c) Myelozyten (eosinophile, basophile)
 - d) Metamyelozyten
 - e) Neutrophilen Stabkernigen
 - f) Neutrophilen Segmentkernigen
 - g) Eosinophilen reifen Zellen
 - h) Basophilen reifen Zellen

Mit Ausnahme der reifen Erythroblasten werden in der Erythropoese sämtliche Zellklassen als teilungsfähig angesehen. In der Granulopoese werden als teilungsfähig eingestuft:

Myeloblast, Promyelozyt, Myelozyt (eosinophil, basophil), Promonozyt und Metamyelozyt.

Bei der Differenzierung der einzelnen Zellformen werden auch deren verschiedene Mitosephasen beurteilt. Je nach der Regenerationsaktivität des Knochenmarks findet man eine unterschiedliche Anzahl Mitosen in den jeweiligen Formen und Reifestufen der Zellen (6, 7), und zwar

1. Prophase Die Kernmembran ist aufgelöst, die einzelnen Chromosomen sind noch nicht sicher voneinander abzugrenzen, sie sind noch zu einem festen Spirem angeordnet. Das zwischen den Chromosomen liegende Protoplasma ist aufgeheilt.
2. Frühe Metaphase Das Spirem hat sich stärker aufgelockert. Die Chromosomen sind über die ganze Zelle verteilt.
3. Späte Metaphase Die verdoppelten Chromosomen sind in einer Ebene, in der Äquatorialplatte oder im Monaster, angeordnet.
4. Anaphase Die geteilten Chromosomen ordnen sich je zur Hälfte an den entgegengesetzten Polen der Kernspindel. Sie haben einen Diaster gebildet.

- | | |
|-------------------------|---|
| 5. Telophase | Die Chromosomen bilden ein lockeres Dispirem. Das Protoplasma ist eingeschnürt. |
| 6. Rekonstruktionsphase | In beiden Zellen liegen die Chromosomen in festem Spirem. Die Kernmembran ist noch nicht ausgebildet. Teilweise besteht zwischen den Zellen noch eine Plasmabrücke. |

Aus den Differentialzählungen wird der prozentuale Anteil der einzelnen Zellklassen graphisch in Reifungskurven, getrennt nach Erythropoese und Granulopoese, dargestellt.

Das Verhältnis aller gezählten Zellen der Granulopoese zur Erythropoese wird im G/E-Index ermittelt. Der Mitoseindex gibt die Anzahl der Mitosen auf 1000 teilungsfähigen Zellen, in Promille ausgedrückt, wieder. In karyologischen Kurven sieht man für Erythropoese und Granulopoese in einem graphischen Bild die prozentuale Verteilung der Mitosephasen für alle Kontroll- und Zusatzpräparate.

Von jeder Stichprobe sollen ungefähr 2000 Zellen ausgezählt werden. Ein Präparat weist bei 96 Stunden Kultivierungszeit allerdings ein so schlechtes Zellmaterial auf, daß nur eine Auszählung von 1000 Zellen möglich ist. Dem Gesamtergebnis dieser Untersuchungen liegen 85826 gezählte Zellen zu Grunde.

Statistische Auswertung

Mit Hilfe des χ^2 -Testes soll entschieden werden, ob die Differenzen zwischen den Ergebnissen der Reifungskurven der Kontrollkulturen und der Zusatzkulturen mit Hydroxyurea als zufällig anzusehen oder ob sie statistisch als signifikant zu bezeichnen sind. Das heißt, es wird der Nachweis geführt, daß die errechneten Werte nicht aus der gleichen Gesamtmenge stammen können (3).

Dieser Test wird ebenfalls zur Signifikanzberechnung der Mitoseindices und für die Verteilung der Mitosephasen durchgeführt. Bei der Berechnung der Signifikanz für die Mitoseindices erfährt der χ^2 -Test eine Abwandlung. Da hier die ausgezählten Werte oft sehr klein sind, ist der χ^2 -Test nur nach einer empirischen Korrektur anwendbar (Yate'sche Korrektur). Die Korrektur der Beobachtungswerte erfolgt nach folgendem Modus. Ist ein Beobachtungswert kleiner als der Erwartungswert, wird der Beobachtungswert um 0,5 erhöht, ist er niedriger, wird er um 0,5 verkleinert. Insgesamt darf eine Randsumme nicht verändert werden. Bei ungerader Klassenzahl dürfen nicht alle Summen geändert werden. Auf diese Art und Weise kann man auch noch kleine Häufigkeiten mit dem χ^2 -Test beurteilen. Bei der Übertragung der χ^2 -Werte auf den Wahrschein-

lichkeitswert p spielt die Anzahl der Freiheitsgrade eine Rolle. Der Freiheitsgrad ist definiert als die Anzahl der Klassen minus eins multipliziert mit der Anzahl der Gruppen minus eins. Eine Klasse nennt man z.B. die Zeit (24 oder 48 Stunden), die Gruppen stellen die einzelnen Zelltypen dar. Eine Berechnung ist dann signifikant, wenn aus dem errechneten χ^2 -Wert das abgelesene p kleiner als 0,01 unter Berücksichtigung des zugehörigen Freiheitsgrades ist. Ist der Wahrscheinlichkeitswert größer als 0,05, liegt keine Signifikanz vor. Das Ablesen des Wahrscheinlichkeitswertes erfolgt aus logarithmischen Kurven, die von PATAU zusammengestellt worden sind (30).

Erläuterungen zu den nachfolgenden graphischen

Kurven

Auf der linken Seite der Abbildungen wurden auf der Abszisse die Zellen der Erythropoese additiv aufgetragen. Es bedeuten die eingezeichneten Intervalle:

PE	Proerythroblasten in %
bE	basophile Erythroblasten in %
pE	polychromatische Erythroblasten in %
oE	orthochromatische Erythroblasten in %
rE	reife Erythroblasten in %

Auf der rechten Seite wurden auf der Abszisse die Zellen der Granulopoese aufgetragen. Hier bedeuten:

Mb	Myeloblasten in %
Pm	Promyelozyten in %
My	neutrophile Myelozyten in %
Eo	eosinophile Myelozyten in %
Pmo	Promonozyten in %
MM	Metamyelozyten in %
Stab	stabkernige Granulozyten in %
Seg	neutrophile Segmentkernige in %
Eos	eosinophile Segmentkernige in %
Mon	Monozyten in %
----	Hydroxyurea-Zusatz
_____	Kontrollauszählung

Um die Übersichtlichkeit der Kurven nicht zu beeinträchtigen, sind die geringen Prozentwerte (kleiner als 1,0 %) für alle basophilen Zellen nicht eingetragen worden.

Auf den Ordinaten wurden den einzelnen Versuchen entsprechend die Kultivierungszeiten wie 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h aufgetragen.

Ergebnisse

Versuch I mit dem Knochenmark des Patienten

G.W.-H., 34 Jahre.

Hydroxyurea-Konzentration 10 μ /ml

Einweisung am 24.9.1973, bis 25.10.1973 stationäre
Behandlung

Klinische Diagnose: chronisch myeloische Leukämie

Therapie zur Zeit der Sternalpunktion:

jeden 3. Tag 2 mg Busulfan

2 x 1 Tablette Zyloric^R

3 x 2 Tabletten Plastulen^R

Blutbild am 29.10.73

Hb	=	10,2 g %
Erythrozyten	=	3,93 Mill./ μ l
Hb _E	=	30,1 pg
Thrombozyten	=	584.000/ μ l
Leukozyten	=	238.000/ μ l
Basophile	=	10,5 %
Eosinophile	=	9,5 %
Myeloblasten	=	4,5 %
Myelozyten	=	12,5 %
Jugendliche	=	11,5 %
Stabkernige	=	15,0 %
Segmentkernige	=	24,0 %
Lymphozyten	=	4,5 %
Monozyten	=	8,0 %

Blutkörperseukungsgeschwindigkeit:

18/34 mm/60 min./mm/120 min.

Sternalpunktion am 19.6.74: chronische Erythroleukämie

Aus den Reifungskurven (Abb. 1a und 1b) ist folgendes abzuleiten:

Im Vergleich zwischen den Kontrollkulturen und den Zusatzkulturen findet man in der Erythropoese (Abb. 1a) nach 24 Stunden Bebrütungszeit eine starke Vermehrung der reifen Erythroblasten. Das Vorhandensein von unreifen Erythroblasten wird zu diesem Zeitpunkt relativ stark zurückgedrängt. Nach 48 Stunden ist die bis dahin verstärkte Zellausreifung geringfügig unterbrochen, weil wieder vermehrt polychromatische und orthochromatische Erythroblasten zu finden sind. Die insgesamt starke Beschleunigung der Zellausreifung setzt beim 72 Stunden-Wert wieder ein. Zu diesem Zeitpunkt werden von der Zusatzkultur wieder die Werte der Kontrollkultur erreicht.

In der Erythropoese ist es durch $10 \mu\text{g/ml}$ Hydroxyurea zu einer signifikanten Zellausreifungsbeschleunigung gekommen (Tab. 1a).

Die Reifungskurve der Granulopoese (Abb. 1b) zeigt zu den verschiedenen Zeitpunkten ein unterschiedliches Verhalten. Während nach 24 Stunden durch Hydroxyurea nur eine geringfügige Vermehrung der reifen Granulozyten, eine stärkere der Myelozyten vorliegt, steigert sich die Beschleunigung der Zellausreifung nach 48 Stunden erheblich. Dabei fällt die starke Vermehrung der segmentkernigen Granulozyten auf. Ferner erkennt man eine starke Verminderung der Promyelozyten zum 24-Stunden-Zeitpunkt, entsprechend

der fehlenden Zellverdoppelung, die die Myelozyten und die eosinophilen unreifen Zellen erst nach 48 Stunden erfahren. Nach 72 Stunden Kultivierungszeit werden wie in der Erythropoese auch in der Granulopoese die Kontrollwerte wieder erreicht. Die Beschleunigung der Zellausreifung nach 24 und 48 Stunden durch 10^{-6} ml Hydroxyurea ist statistisch signifikant (Tab. 1b).

In der Erythropoese und in der Granulopoese werden unter Zusatz von Hydroxyurea während der Bebrütungszeit keine Mitosen beobachtet. Es liegt eine vollständige Blockierung der Regeneration des Knochenmarks vor (Tab. 7, 8, Seite 72/73).

Der G/E-Index ist bei den Zusatzkulturen im Vergleich mit den Kontrollkulturen für alle drei Beobachtungszeitpunkte stark erhöht, woraus eine Reifung der Erythroblasten bis zu Erythrozyten geschlossen werden kann (Tab. 6, Seite 70).

Erythropoese

Patient G.W.-H.

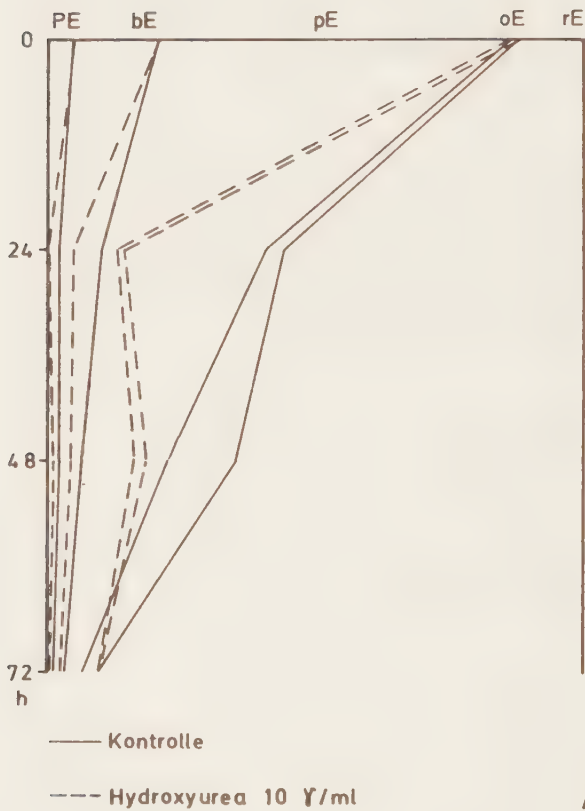


Abb. 1a

Granulopoese

Patient G.W.-H

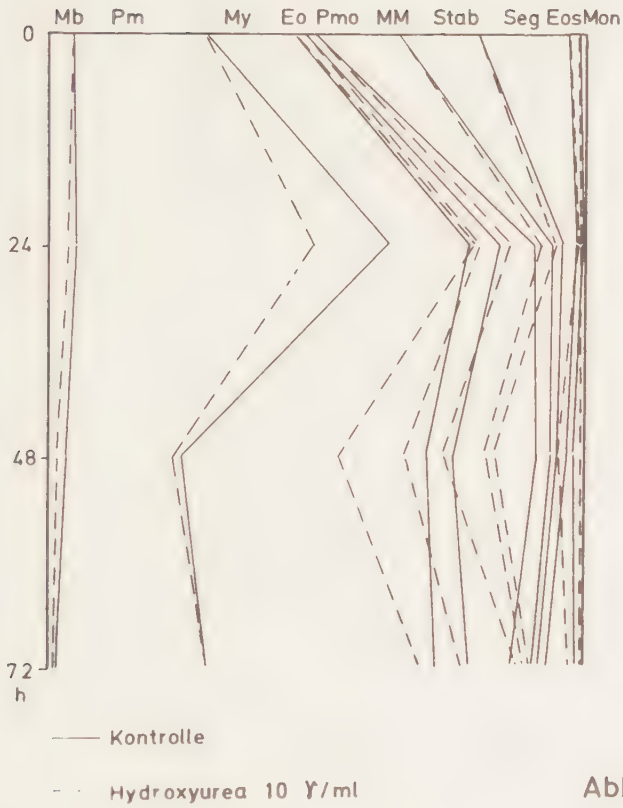


Abb. 1b

Tabelle 1a: χ^2 -Test für Fall I.

Erythropoese

24 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_4
PE	13	0	8,846
bE	57	21	5,961
pE	208	37	65,550
oE	19	4	5,094
rE	379	398	37,123
Summe	676	460	122,575

$p = < 10^{-10}$ (signifikant)

48 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_4
PE	8	4	0,272
bE	36	15	2,706
pE	116	59	3,567
oE	94	9	43,665
rE	462	405	12,862
Summe	716	492	63,071

$p = < 10^{-10}$ (signifikant)

72 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_4
PE	3	0	1,710
bE	11	5	0,177
pE	24	28	6,915
oE	22	0	12,542
rE	589	337	0,003
Summe	649	370	21,347

$p = 3 \cdot 10^{-4}$ (signifikant)

Tabelle 1b: χ^2 -Test für Fall I.

Granulopoese

24 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_7
Mb	56	41	2,525
PM	689	546	18,527
My	202	357	40,932
eM	55	23	13,560
MM	44	70	5,587
St	16	4	7,362
Se	43	83	12,169
Rest	83	80	0,103
Summe	1188	1204	100,765

$p = < 10^{-10}$ (signifikant)

48 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_7
Mb	28	14	8,220
PM	180	234	0,239
My	386	323	27,381
eM	42	120	23,036
MM	29	75	11,860
St	9	20	2,182
Se	13	130	73,252
Rest	160	133	11,700
Summe	847	1049	157,868

$p = < 10^{-10}$ (signifikant)

Versuch II mit dem Knochenmark der Patientin
R.G., 43 Jahre.

Hydroxyurea-Konzentration 10 μ /ml

Einweisung am 6.3.1974, bis 24.5.1974 stationäre
Behandlung

Klinische Diagnose: akuter Myeloblastenschub bei
Erythrämie

Therapie zur Zeit der Sternalpunktion:

2 x 75 mg Alexan^R i.v. täglich
über zehn Tage

Wegen einer Leukozytendepression bis 900, Thrombo-
penie bis 6000/ μ l und Hb bis unter 4,4 g % werden
sechs Frischblutkonserven, eine Thrombokonserve
verordnet, wegen einer Bronchopneumonie inter-
mittierend Cephalotin^R, Refobacin^R. Wegen Beinödeme:
Digitalis. Weitere cytostatische Behandlung: Im
fünftägigen Zyklus alternierend 100 mg Lanvis^R
täglich, bzw. 2 x 75 mg Alexan^P täglich. Zehntägi-
ger therapiefreier Intervall.

Blutbild: Hb	=	10,1 g %
Erythrozyten	=	2,93 Mill./ μ l
Hb _E	=	33,9 pg
Thrombozyten	=	51.000/ μ l
Leukozyten	=	1.300/ μ l
Myeloblasten	=	3 %
Stabkernige	=	7 %
Segmentkernige	=	49 %
Lymphozyten	=	37 %
Monozyten	=	4 %

Sternalpunktion am 14.5.74: Erythrämie di Guglielmo

Aus der Reifungskurve der Erythropoese (Abb. 2a) erkennt man eine auf Zusatz von 10 μ /ml Hydroxyurea beruhende starke Beschleunigung der Zellausreifung, die erst beim 72 Stunden-Beobachtungswert in eine leichte Verzögerung übergeht, wobei sich nur der relative Anteil der orthochromatischen Erythroblasten wieder vergrößert hat. Unreife Proerythroblasten sind schon nach 24 Stunden nicht mehr zu beobachten.

Die relative Anzahl der basophilen und polychromatischen Erythroblasten nimmt gleichmäßig ab.

Die Ausreifungsbeschleunigung in der Erythropoese ist statistisch signifikant (Tab. 2a).

In der Granulopoese (Abb. 2b) findet man unter Zusatz von 10 μ /ml Hydroxyurea nach 24 Stunden nur eine unwesentliche Beschleunigung der Zellausreifung, die nach 48 Stunden langsam und nach 72 Stunden schon sehr deutlich in eine Verzögerung übergeht. Während für den 24 Stunden-Beobachtungswert bei den unreifen weißen Zellen noch eine Linksverschiebung zu erkennen ist, sind nach 48 Stunden bis auf den Anteil der Promyelozyten alle übrigen Kurven nach rechts verschoben; das ist besonders deutlich nach 72 Stunden Kultivierungszeit zu sehen.

Die Berechnung ergibt eine statistische Signifikanz für alle drei Beobachtungszeitpunkte (Tab. 2b).

Das Fehlen von Mitosen bestätigt eine vollständige Blockierung der Regenerationsfähigkeit von roten und weißen Zellen.

Der G/E-Index ist im Vergleich der Kontrollkulturen mit den Zusatzkulturen für alle Beobachtungszeitpunkte erniedrigt.

Erythropoese

Patientin R.G.

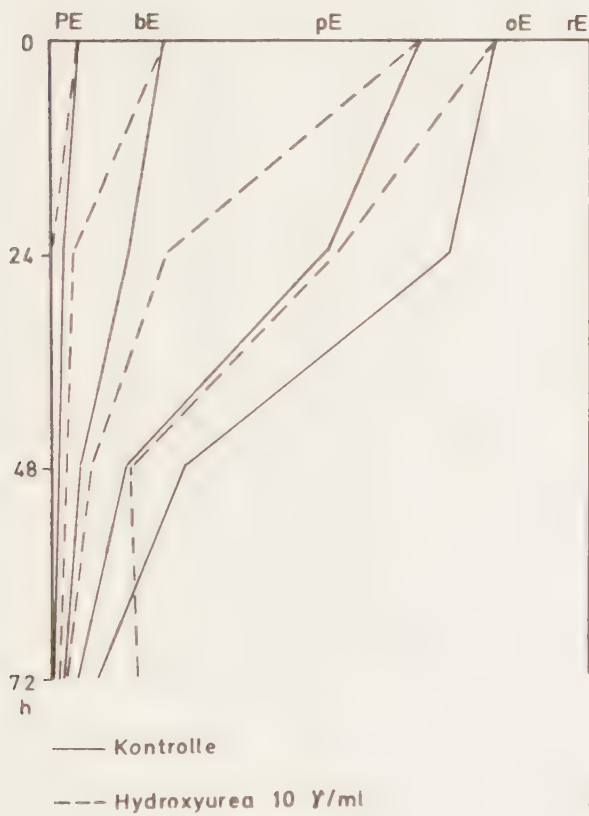


Abb. 2a

Granulopoese

Patientin R.G.

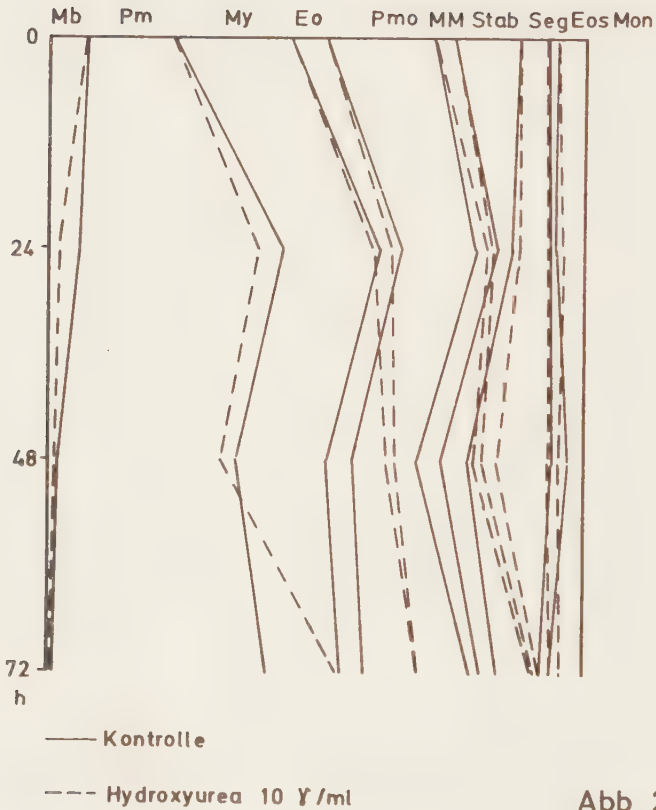


Abb. 2b

Tabelle 2a: χ^2 -Test für Fall II.

Erythropoese

24 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_4
PE	20	1	20,847
bE	111	38	50,111
pE	321	187	63,264
oE	210	341	12,493
rE	232	499	56,728
Summe	894	1066	203,443

$p = < 10^{-10}$ (signifikant)

48 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_4
PE	1	0	0,969
bE	28	15	3,532
pE	53	26	8,398
oE	66	41	5,081
rE	464	511	3,991
Summe	612	593	21,971

$p = 2 \cdot 10^{-4}$ (signifikant)

72 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_3
PE	0	0	0,000
bE	10	2	6,079
pE	14	10	1,071
oE	18	77	31,657
rE	475	476	1,787
Summe	517	565	40,594

$p = 10^{-8}$ (signifikant)

Tabelle 2b: χ^2 -Test für Fall II.

Granulopoese

24 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_7
Mb	56	10	14,225
PM	351	210	0,011
My	167	121	2,343
eM	37	16	1,255
MM	34	8	6,188
St	26	20	0,667
Se	70	32	1,709
Rest	180	139	4,779
Summe	921	556	31,176

$p = < 10^{-4}$ (signifikant)

48 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_7
Mb	13	1	7,686
PM	337	251	0,360
My	174	243	34,906
eM	42	5	21,131
MM	41	27	0,489
St	53	25	4,457
Se	155	66	17,714
Rest	185	165	1,481
Summe	1000	783	88,224

$p = < 10^{-10}$ (signifikant)

72 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_5
Mb	10	4	0,409
PM	358	276	12,298
My	120	77	0,437
St	25	5	5,236
Se	69	10	19,820
Rest	307	146	4,096
Summe	889	518	42,295

$p = < 10^{-7}$ (signifikant)

Versuch III mit dem Knochenmark der Patientin
T.B., 39 Jahre.

Hydroxyurea-Konzentration 60 μ /ml

Einweisung durch Überweisung am 16.4.1973, aus
ambulanter Behandlung

Klinische Diagnose: Anämie und stark erhöhte BSZ
unklarer Genese nach gripptalem
Infekt mit sehr hoher Senkung
und Fieber. Alkoholabusus.

Therapie zur Zeit der Sternalpunktion:

Keine Medikation

Blutbild am 16.4.1973:

Hb	= 9,1 g %
Thrombozyten	= 425.000/ μ l
Leukozyten	= 6.200/ μ l
Eosinophile	= 2 %
Jugendliche	= 1 %
Stabkernige	= 3 %
Segmentkernige	= 56 %
Lymphozyten	= 31 %
Monozyten	= 7 %

Blutkörperensenkungsgeschwindigkeit:

am 5.4.73	153/168
am 12.4.73	130/136
am 16.4.73	125/138 mm/60 min/mm/120 min

Sternalpunktion am 24.4.73: Im Vordergrund stark
stimulierte Erythropoese mit relativ hohem Megalo-
blastenanteil bei Eisenmangel im Knochenmark, ein Er-
scheinungsbild, wie es bei Alkoholabusus vorkommt.

Im Vergleich der Kontrollkulturen mit den Zusatzkulturen (Abb. 3a) zeigt die Reifungskurve der Erythropoese bei Zusatz von 60 μ /ml Hydroxyurea nach dem ersten Kulturtag eine starke Beschleunigung der Zellausreifung, die sich an den nächsten Tagen kontinuierlich verstärkt. Bei dem hier zusätzlich eingeschobenen 12-Stundenwert liegt allerdings noch eine Verzögerung der Zellausreifung vor. Proerythroblasten werden nach 24 Stunden nicht mehr beobachtet. Basophile Erythroblasten verschwinden nach 48 Stunden und treten nach 72 Stunden relativ gering wieder auf. Die ermittelten Werte sind für 12 h, 24 h, 48 h und 72 h statistisch signifikant (Tab. 3a).

Auch in der Granulopoese (Abb. 3b) dominiert die beschleunigte Zellausreifung mit einer starken Vermehrung der Stabkernigen- und Segmentkernigen Granulozyten durch Zusatz von 60 μ /ml Hydroxyurea. Der relative Zellanteil der Promyelozyten und Myelozyten erfährt eine starke Verminderung. Im Gegensatz zur Erythropoese haben die reifen Granulozyten schon zum 12-Stundenwert ihren höchsten Zellanteil. Die beschleunigte Zellausreifung in der Granulopoese ist ebenfalls nach 12 h, 24 h, 48 h und 72 h statistisch signifikant (Tab. 3b).

Die Regenerationsfähigkeit der Erythroblasten ist zu Beginn der Beobachtungszeit nur reduziert und

erst am dritten Tage vollständig blockiert.

In der Granulopoese zeigen die Mitoseindices eine sofort auftretende starke Hemmung der Zellregeneration, jedoch auch kein Verschwinden von Mitosen wie bei den Leukämien.

Die G/E-Indices zeigen kein einheitliches Bild.

Die Werte schwanken. Der Index ist entsprechend der Reifungskurve der Erythropoese nach 12 Stunden stark erhöht, nimmt dann jedoch konstant ab.

Erythropoese

Patientin T.B.

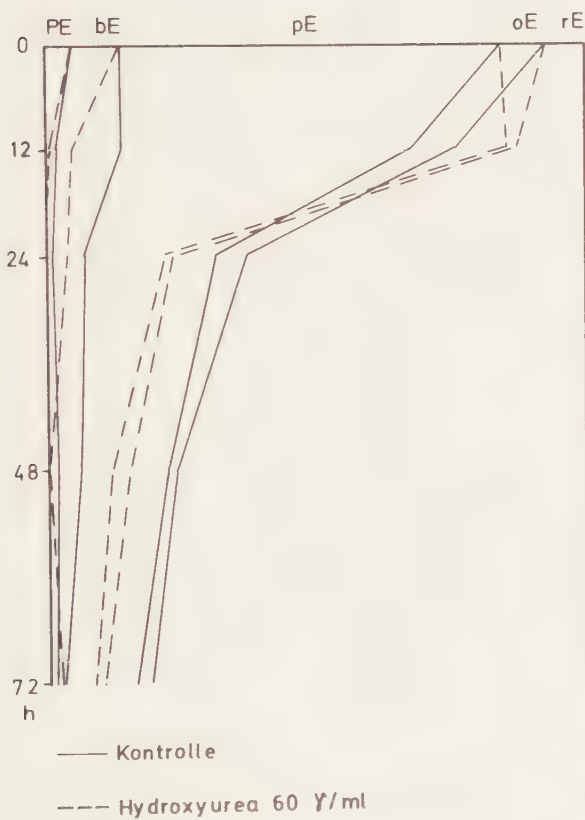


Abb. 3a

Granulopoese

Patientin T.B.

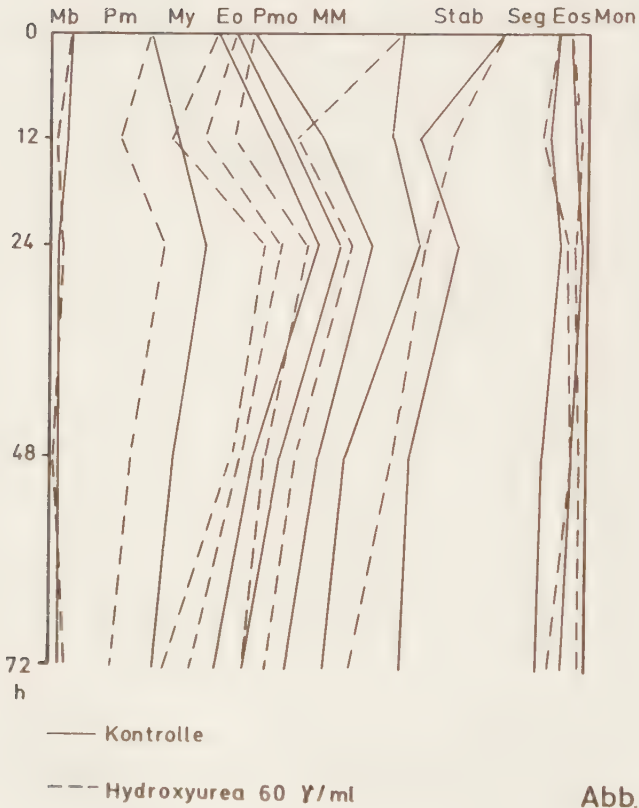


Abb. 3b

Tabelle 3a: χ^2 -Test für Fall III.

Erythropoese

12 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_4
PE	13	5	0,290
bE	74	12	15,114
pE	350	263	22,806
oE	47	5	13,575
rE	157	42	14,293
Summe	641	327	66,079

$p = < 10^{-10}$ (signifikant)

24 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_4
PE	5	3	0,402
bE	29	17	2,540
pE	119	86	3,739
oE	29	1	24,716
rE	312	362	6,764
Summe	494	469	38,162

$p = 10^{-6}$ (signifikant)

48 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_4
PE	5	0	7,097
bE	15	0	21,290
pE	57	59	2,914
oE	6	12	0,475
rE	<u>258</u>	<u>413</u>	<u>2,300</u>
Summe	341	484	34,076

$p = < 10^{-6}$ (signifikant)

72 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_4
PE	2	1	0,607
bE	11	8	1,417
pE	52	37	7,170
oE	14	5	6,636
rE	<u>339</u>	<u>474</u>	<u>2,277</u>
Summe	418	525	18,107

$p = 0,0015$ (signifikant)

Tabelle 3b: χ^2 -Test für Fall III.

Granulopoese

12 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_5
Mb	40	11	17,720
PM	256	162	25,219
My	215	127	26,443
St	50	386	245,321
Rest	383	394	0,033
Summe	1254	1307	331,237

$p = < 10^{-10}$ (signifikant)

24 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_5
PM	314	210	14,242
eM	40	23	3,517
MM	94	77	0,739
St	86	147	20,370
Rest	365	302	2,464
Summe	1104	1032	56,150

$p = 10^{-10}$ (signifikant)

48 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_4
Mb	12	0	10,696
My	167	198	7,426
St	135	181	13,070
Se	270	330	14,928
Rest	520	275	50,134
Summe	1104	984	96,254

$p = < 10^{-10}$ (signifikant)

72 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_5
PM	182	88	26,997
AM	52	59	1,006
MM	82	40	11,901
St	149	161	1,556
Se	262	360	22,396
Rest	318	272	1,243
Summe	1045	980	65,099

$p = < 10^{-10}$ (signifikant)

Versuch IV mit dem Knochenmark der Patientin
M.T., 72 Jahre.

Hydroxyurea-Konzentration 60 *µ*/ml

Einweisung am 17.8.1973, bis 6.9.1973 stationäre
Behandlung

Klinische Diagnose: Panzytopenie bei Hepatospleno-
megalie, Mitralvitium, latenter
Diabetes melitus, chronische
Pyelonephritis

Therapie zur Zeit der Sternalpunktion:

Digitalis und Diuretika,
9 x 250 ml gewaschene Erythrozyten,
1 x 1000 gamma Cytobion^R
Lanitop^R 1 1/2 Tabl. / die
Aldactone^R 2 x 1 Dragee,
Saltucin^R 1 Tabl. / die

Blutbild am 13.8.1973 (ambulant):

Hb	=	8,6 %
Erythrozyten	=	3.11 Mill./ <i>µ</i> l
Hb _E	=	27,6 pg
Thrombozyten	=	45.000/ <i>µ</i> l
Leukozyten	=	2.250/ <i>µ</i> l
Eosinophile	=	1 %
Stabkernige	=	2 %
Segmentkernige	=	62 %
Lymphozyten	=	29 %
Monozyten	=	6 %

Blutkörperniedrigungsgeschwindigkeit:

14/35 mm/60 min./mm/120 min.

Sternalpunktion am 17.8.1973: Vermehrte Erythropoese,
es kommen auch Megaloblasten und vermehrt Megalo-
blastoide vor. Monopoese ebenfalls gesteigert. Keine
idiopathische Thrombopenie. Splenogene Markhemmung
wahrscheinlich.

Der Verlauf der Reifungskurven der Erythropoese (Abb. 4a) zeigt unter Zusatz von 60 γ /ml Hydroxyurea insgesamt eine Beschleunigung der Zellausreifung, die nach 12 Stunden noch sehr schwach ausgeprägt und erst im weiteren Verlauf deutlicher zu erkennen ist. Am dritten Beobachtungstag tritt wieder eine geringe Verzögerung der Zellausreifung auf.

Proerythroblasten werden schon nach 12 Stunden nicht mehr beobachtet, die übrigen teilungsfähigen Zellen der roten Reihe erreichen bei Versuchsende fast wieder die relativen Werte der Kontrollauszählung. Die Auswertung der Erythropoese ist für alle Zeitpunkte statistisch signifikant (Tab. 4a).

Im Kurvenverlauf der Granulopoese (Abb. 4b) steht eine Linksverschiebung im Vordergrund. Die vorhandene Tendenz zu einer beschleunigten Zellausreifung ist nach 12 und nach 48 Stunden am stärksten ausgeprägt. Sie erfährt nach 24 und nach 72 Stunden jedoch eine Unterbrechung. Während nach 24 Stunden die Kontrollwerte sogar überschritten werden, werden sie nach 72 Stunden nicht erreicht. Hierbei macht sich eine starke relative Verminderung der Promyelozyten und ein wachsender Anteil der Segmentkernigen Zellen bemerkbar.

Das ausgewertete Zahlenmaterial zeigt für alle Zeiträume unter Zusatz von 60 γ /ml Hydroxyurea auch in der Granulopoese Signifikanz (Tab. 4b).

Die Mitoseindices ergeben in der roten und in der weißen Reihe eine vollständige Blockierung der Zellregeneration. Dem errechneten Mitoseindex in der Granulopoese nach 48 Stunden liegt nur eine beobachtete Mitose zu Grunde. Die Werte der G/E-Indices zeigen sich konstant. Es tritt nur eine geringfügige Schwankungsbreite auf.

Erythropoese

Patientin MT.

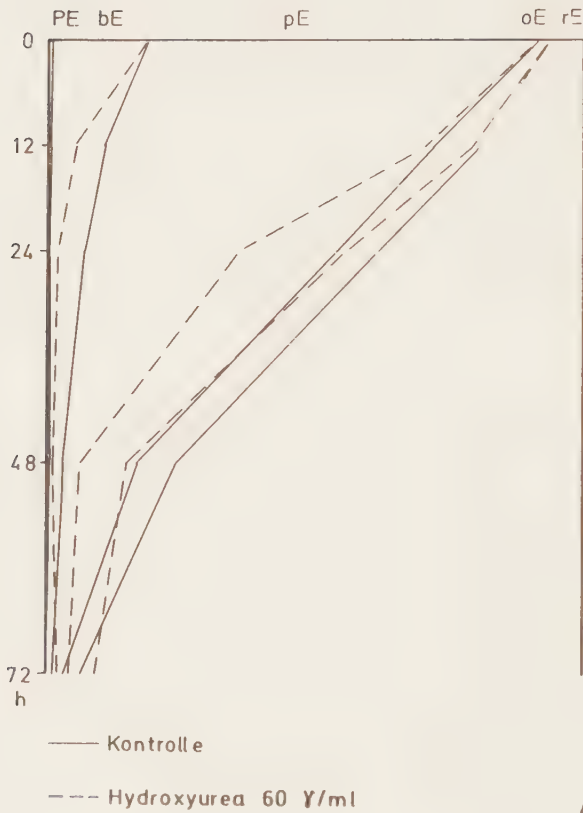


Abb. 4a

Granulopoese

Patientin M.T.

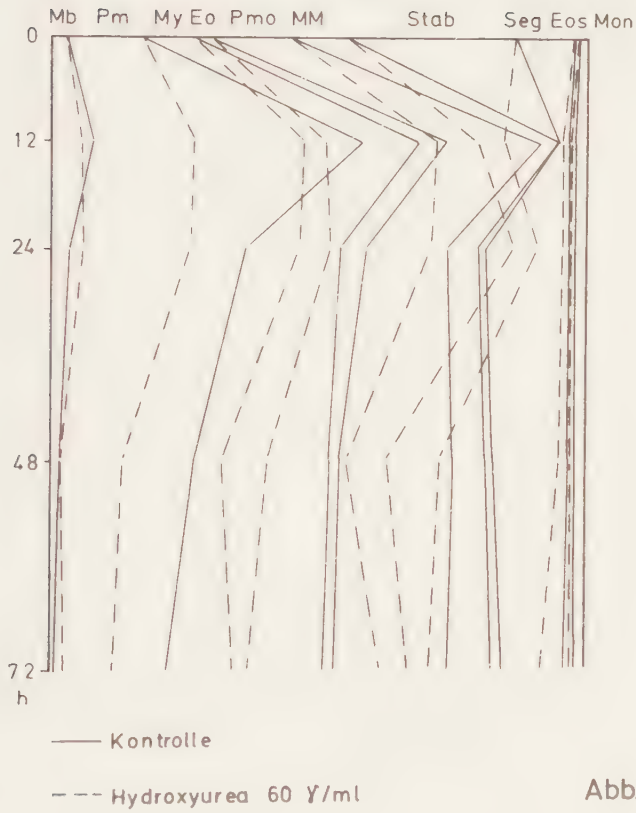


Abb. 4b

Tabelle 4a: χ^2 -Test für Fall IV.

Erythropoese

12 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_4
PE	2	2	0,001
bE	113	49	23,076
pE	620	645	1,776
oE	82	90	0,709
rE	189	185	0,018
Summe	1006	971	25,581

$p = < 10^{-4}$ (signifikant)

24 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_3
PE	0	0	0,000
bE	63	12	19,880
pE	430	203	22,503
oE	73	139	51,240
rE	343	287	4,584
Summe	909	641	98,207

$p = < 10^{-10}$ (signifikant)

48 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_4
PE	3	0	2,720
bE	24	14	1,747
pE	132	39	41,974
oE	65	73	1,583
rE	<u>707</u>	<u>718</u>	<u>4,598</u>
Summe	931	844	52,621

$p = < 10^{-10}$ (signifikant)

72 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_3
PE	0	0	0,000
bE	5	9	3,061
pE	12	15	2,275
oE	43	40	1,643
rE	<u>905</u>	<u>614</u>	<u>0,447</u>
Summe	965	678	7,426

$p = < 0,05$ (noch signifikant)

Tabelle 4 b: χ^2 -Test für Fall IV.

Granulopoese

12 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_6
Mb	54	39	3,812
PM	351	166	82,377
My	70	147	21,409
eM	41	32	1,974
St	1	38	32,133
Se	19	95	36,709
Rest	154	242	13,027
Summe	690	749	191,496

$p = < 10^{-10}$ (signifikant)

24 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_6
Mb	26	32	2,792
My	115	112	2,360
MM	35	83	32,493
St	8	24	12,245
Se	110	27	33,511
eo	7	5	0,033
Rest	390	266	3,690
Summe	691	549	87,124

$p = < 10^{-10}$ (signifikant)

48 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_5
PM	206	113	37,349
eM	18	73	28,019
HM	48	74	3,246
St	15	106	59,757
Se	126	198	9,612
Rest	<u>410</u>	<u>346</u>	<u>13,784</u>
Summe	823	910	151,767

$p = < 10^{-10}$ (signifikant)

72 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_5
PM	178	44	23,870
Hy	233	99	4,698
HM	61	22	2,939
St	23	18	1,260
Se	97	92	14,305
Rest	<u>227</u>	<u>176</u>	<u>11,719</u>
Summe	819	451	58,792

$p = < 10^{-10}$ (signifikant)

Versuch V mit dem Knochenmark der Patientin

W.F., 87 Jahre

Hydroxyurea-Konzentration 10 μ /ml

Klinische Diagnose: Thrombopenische Purpura un-
klarer Genese, Pleuropneumonie
rechts basal

Therapie zur Zeit der ambulanten Sternalpunktion:

Lanicor^R 1 Tabl./ die,

15 mg Ultracorten^R, 50 mg Imurel^R

Blutbild am 7.1.1974:

Hb	=	9,2 g %
Erythrozyten	=	3.26 Mill./ μ l
Hb _E	=	28,2 pg
Thrombozyten	=	80.000/ μ l
Leukozyten	=	5.600/ μ l
Stabkernige	=	1 %
Segmentkernige	=	68 %
Lymphozyten	=	21 %
Monozyten	=	10 %
Retikulumzellen	=	13 %

Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit:

25/51 mm/60 min./mm/120 min

Sternalpunktion am 10.1.1974:

Megakaryozyten-Vermehrung mit patholo-
gischen Formen. Reichliche Eisenspeiche-
rung und Megaloblastoide. Angeregte Mono-
poese.

In den Reifungskurven der Erythropoese (Abb. 5) erkennt man nach 12 und nach 24 Stunden Beobachtungszeit durch Zusatz von 10 μ /ml Hydroxyurea eine starke Verzögerung der Zellausreifung, die erst zum späteren Zeitpunkt in eine totale Zellausreifung übergeht. Nach 96 Stunden sind in der Erythropoese nur noch reife Erythroblasten gezählt worden. Es ist zu beachten, daß in diesem Versuch der letzte Beobachtungszeitpunkt erst nach 96 Stunden liegt und außerdem zu diesem Zeitpunkt nur 1000 Zellen ausgezählt werden, weil viele Ausstrichsareale zerstört sind. Die ausgewerteten Ergebnisse sind zu allen Zeitpunkten statistisch signifikant (Tab. 5a).

Aus den Reifungskurven der Granulopoese ersieht man nach 12 Stunden Kultivierungszeit mit 10 μ /ml Hydroxyurea eine geringe Verzögerung der Zellausreifung mit starker relativer Vermehrung der Myelozyten, während der relative Anteil der übrigen Zelltypen kaum verändert erscheint. Diese Verzögerung verstärkt sich nach Ablauf des ersten Beobachtungstages, bleibt weiter bestehen trotz relativer Vermehrung der reifen Zellen und geht nach 96 Stunden in eine Verzögerung über. Zu diesem Zeitpunkt werden von den reifen Zellen die Kontrollwerte fast wieder erreicht. Nur Promyelozyten und Promonozyten zeigen hier eine starke Vermehrung.

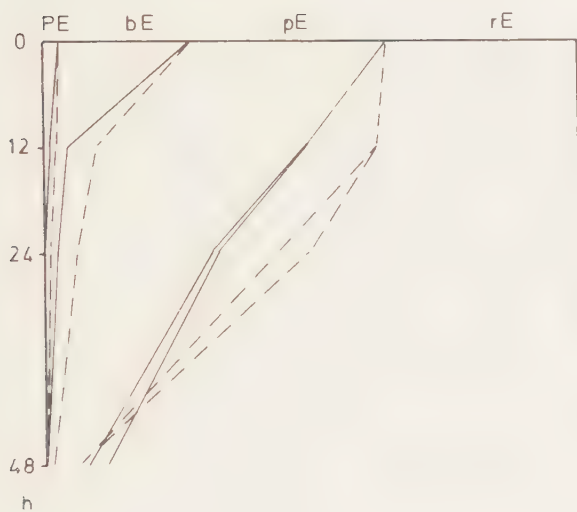
Statistische Signifikanz wird für alle Beobachtungszeitpunkte errechnet (Tab. 5b).

In der Erythropoese ist die Zellregeneration des Knochenmarks sofort vollständig blockiert, während für die weiße Reihe aus dem Mitoseindex zuerst nur eine Hemmung abzuleiten ist. Eine vollständige Blockierung ist jedoch am vierten Tage ebenfalls eingetreten.

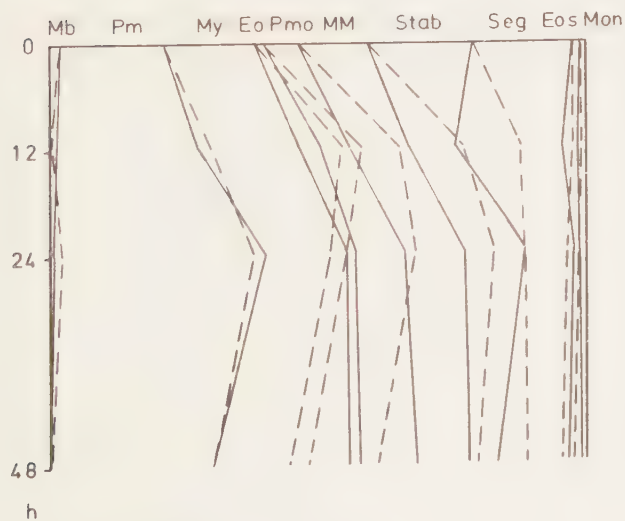
Der G/E-Index zeigt im Vergleich mit den Kontrollkulturen wechselndes Verhalten. Er steigt nach 12 Stunden an, wird nach 24 Stunden wieder kleiner und bleibt dann nach 48 und nach 96 Stunden konstant erniedrigt.

Erythropoese

Patientin W.F.



Granulopoese



— Kontrolle

--- Hydroxyurea 10 Y/ml

Abb. 5

Tabelle 5a: χ^2 -Test für Fall V.

Erythropoese

12 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_3
PE	6	9	2,186
bE	30	38	6,044
pE	291	240	3,489
oE	0	0	0,000
rE	335	177	9,311
Summe	662	464	21,031

$p = 10^{-4}$ (signifikant)

24 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_4
PE	2	8	5,829
bE	11	22	8,040
pE	139	142	7,839
oE	1	37	47,249
rE	565	317	14,536
Summe	718	526	83,492

$p = < 10^{-10}$ (signifikant)

48 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_3
PE	0	0	0,000
bE	0	4	2,835
pE	21	17	2,976
oE	10	0	14,111
rE	239	360	0,612
Summe	270	381	20,534

$p = < 5 \cdot 10^{-4}$ (signifikant)

96 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_2
PE	0	0	0,000
bE	0	0	0,000
pE	14	0	7,031
oE	9	0	4,520
rE	200	112	0,852
Summe	223	112	12,403

$p = 0,002$ (signifikant)

Tabelle 5b: χ^2 -Test für Fall V.

Granulopoese

12 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_4
My	187	286	8,494
St	95	134	2,062
Se	201	134	25,607
eo	34	7	22,230
Rest	515	640	1,230
Summe	1032	1201	59,623

$p = < 10^{-10}$ (signifikant)

24 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_4
PM	440	333	1,871
eM	18	22	1,447
St	124	50	19,787
Se	98	83	0,008
Rest	447	454	8,578
	1127	942	31,691

$p = 10^{-5}$ (signifikant)

48 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_5
My	360	170	32,494
eM	28	40	5,749
St	52	109	35,485
Se	203	68	40,832
eo	19	19	0,487
Rest	<u>718</u>	<u>695</u>	<u>13,238</u>

Summe 1380 1101 128,284

$p = < 10^{-10}$ (signifikant)

96 h

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	χ^2_5
Mb	3	0	0,779
PM	219	87	11,412
MM	214	26	14,040
St	94	23	0,066
Se	118	34	0,284
Rest	<u>584</u>	<u>150</u>	<u>0,015</u>

Summe 1232 320 26,597

$p = < 10^{-4}$ (signifikant)

Zusammenfassung der Ergebnisse

Das Verhältnis von Granulopoese zur Erythropoese wird im G/E-Index ermittelt. Eine Größenordnung, die zwischen drei und vier liegt, wird als normal angesehen. Bei fast allen Anämien kann ein Index, der kleiner als drei ist, errechnet werden.

In der Tabelle 6 sind alle Ergebnisse der fünf Versuchsreihen zusammengefaßt, getrennt nach ausgezählten Kontrollpräparaten und Hydroxyureazusatzpräparaten. Aus den Werten wird in dieser Zusammenfassung jeweils nur das arithmetische Mittel beurteilt und diskutiert. Nicht berücksichtigt werden alle 12 Stunden-Mittelwerte, die nur für drei Versuchsreihen ermittelt werden konnten. Die Beurteilungsgrundlage für den 72 Stunden-Wert umfaßt vier Versuchsreihen, da die Kultivierungszeit des Falles V erst nach 96 Stunden abgeschlossen werden konnte. Unberücksichtigt bleiben in dieser Zusammenstellung auch die unterschiedlichen Konzentrationen des zugesetzten Hydroxyurea.

Der Mittelwert der G/E-Indices der Kulturen ohne einen Zusatz liegt nach 24 Stunden unter dem Wert des Erstausstreichs. Nach 48 Stunden steigt der Wert wieder an, er ist jetzt größer als zum Zeitpunkt Null. Am dritten Beobachtungstag, nach 72 Stunden,

fällt der Mittelwert wieder ab.

Die Mittelwerte der G/E-Indices der Hydroxyurea-Präparate zeigen folgende Tendenz: Der 24 Stundenwert liegt ein wenig höher als der des entsprechenden Kontrollausstrichs. Für 48 Stunden steigt der Mittelwert etwas an, er liegt jedoch noch deutlich unter dem Wert des entsprechenden Kontrollpräparates. Nach 72 Stunden hat sich der Mittelwert auf den 24 Stundenwert der Zusatzkulturen zurückgebildet. Er entspricht dem 72 Stunden-Mittelwert der Kontrollkulturen.

Die etwas niedrigen G/E-Indices in den Zusatzpräparaten lassen sich durch die insgesamt stärkere Hemmung der Mitoserate in der weißen Reihe erklären oder durch die starke Ausreifung der Erythroblasten zu Erythrozyten.

Tabelle 6: G/E-Indices

Kontrollen						
Fall	0h	12h	24h	48h	72h	96h
I	3,6	-	1,8	1,2	1,3	-
II	0,6	-	1,0	1,6	1,9	-
III	2,5	2,0	2,2	3,2	2,5	-
IV	2,0	0,7	0,8	0,9	0,9	-
V	2,4	1,6	1,6	5,1	-	5,5
Summe	11,1	4,3	7,4	12,0	6,6	5,5
Mittelwert	2,22	1,43	1,48	2,40	1,65	5,5

Hydroxyurea						
Fall	12h	24h	48h	72h	96h	
I	-	2,6	2,1	2,9	-	
II	-	0,5	1,3	0,9	-	
III	4,0	2,2	2,0	1,9	-	
IV	0,8	0,9	1,0	0,7	-	
V	2,6	1,8	2,9	-	2,9	
Summe	7,4	8,0	9,3	6,4	2,9	
Mittelwert	2,46	1,60	1,86	1,60	2,9	

Um die Auswirkung des zugesetzten Hydroxyurea auf die Knochenmarkregeneration zu prüfen, vergleicht man die ermittelten Mitoseindices der Kontrollpräparate mit denen der Zusatzpräparate (Tab. 7, 8). Dabei muß berücksichtigt werden, daß sich der Mittelwert für die 12 Stundenausstriche wieder nur aus drei Versuchsreihen zusammensetzt und deshalb nicht beurteilt werden soll. Für den 96 Stunden-Beobachtungszeitraum liegt nur ein Wert vor, der 72 Stunden-Wert umfaßt nur vier Versuchsreihen.

In der Erythropoese und Granulopoese ergeben die Mittelwerte folgendes Bild. Ausgehend vom Mittelwert des Originalausstrichs zum Zeitpunkt 0, nehmen die Werte für die Kontrollpräparate ständig ab und sind nach 72 Stunden für beide Reihen am niedrigsten. Diese kontinuierliche Abnahme der Werte findet man auch für die Mitoseindices der Zusatzpräparate in der Erythropoese und in der Granulopoese.

Die Mitoseindices der Hydroxyureazusatzpräparate sind, verglichen mit den Kontrollkulturen, in der roten und in der weißen Reihe für alle Beobachtungszeitpunkte deutlich kleiner.

Tabelle 7: Mitoseindices für die Erythropoese in %

Kontrollen

Fall	0h	12h	24h	48h	72h	96h
I	9,2	-	10,1	3,9	0,0	-
II	13,7	-	7,6	0,0	0,0	-
III	38,5	39,5	55,0	36,2	25,3	-
IV	25,2	2,5	5,3	4,5	0,0	-
V	18,0	9,2	6,5	0,0	-	0,0
Summe	104,6	51,0	84,5	44,6	25,3	0,0
Mittelwert	20,92	17,0	16,9	8,92	6,32	0,0

Hydroxyurea

Fall	12h	24h	48h	72h	96h
I	-	0,0	0,0	0,0	-
II	-	0,0	0,0	0,0	-
III	17,5	18,7	14,1	0,0	-
IV	0,0	0,0	0,0	0,0	-
V	0,0	0,0	0,0	-	0,0
Summe	17,5	18,7	14,1	0,0	0,0
Mittelwert	5,83	3,74	2,82	0,0	0,0

Tabelle 8: Mitoseindices für die Granulopoese in %

Kontrollen

Fall	0h	12h	24h	48h	72h	96h
I	11,6	-	10,8	5,0	3,9	-
II	6,1	-	7,8	10,9	5,5	-
III	27,2	19,8	31,5	18,0	18,5	-
IV	24,8	7,7	7,3	4,5	0,0	-
V	6,7	8,7	5,7	5,5	-	3,0
Summe	76,4	36,2	63,1	43,9	27,9	3,0
Mittelwert	15,28	12,06	12,62	8,78	6,97	3,0

Hydroxyurea

Fall	12h	24h	48h	72h	96h
I	-	0,0	0,0	0,0	-
II	-	0,0	0,0	0,0	-
III	5,0	5,2	2,2	2,6	-
IV	0,0	0,0	1,8	0,0	-
V	2,2	3,8	1,1	-	0,0
Summe	7,2	9,0	5,1	2,6	0,0
Mittelwert	2,4	1,8	1,02	0,65	0,0

Für den 24 und für den 48 Stundenzeitraum wird, da zu diesem Zeitpunkt alle fünf Versuchsreihen Stichproben aufweisen, in der Erythropoese und in der Granulopoese eine Signifikanzberechnung für die Mitoseindices durchgeführt (Tab. 9a, 9b).

In der Erythropoese ist für den 24 Stundenzeitraum die Verkleinerung des Mittelwertes um ca. 13 % nach Zusatz von Hydroxyurea statistisch signifikant. Für den gleichen Zeitraum beträgt die Differenz in der Granulopoese rund 10 %. Auch dieser Unterschied ist signifikant.

Nach 48 Stunden Kultivierungszeit ist die Gesamtzahl der beobachteten Mitosen in der Erythropoese für Zusatz und Kontrolle sehr klein. Für die Differenz von 6 % der gemittelten Werte kann auch nach der Yates'schen Korrektur keine Signifikanz errechnet werden. In der Granulopoese liegt jedoch für einen Unterschied von knapp 8 % auch hier Signifikanz vor.

Hydroxyurea übt also eine starke hemmende Wirkung auf die Regeneration des Knochenmarks für beide Zellreihen aus. Diese Aussage beruht auf der Beurteilung der Mittelwerte. Tatsächlich erfolgt bei Zusatz von Hydroxyurea in der Erythropoese in vier Versuchsreihen eine vollständige Blockierung der Knochenmarkregeneration. In der Granulopoese gilt diese Feststellung für die Versuchsreihen I, II und IV. Eine Abhängigkeit von den unterschiedlichen Konzentrationsstärken des zugesetzten Hydroxyurea ist nicht erkennbar.

Tabelle 9a: Signifikanzberechnung der Mitosen

24 Stunden Erythropoese

	B _m	B _{nm}	B _{m+nm}	E _m	E _{nm}
Kontrolle	22	1338	1860	14,1	1845,9
Zusatz	2	1297	1299	9,8	1289,2
Summe	24		3159		

$$\chi^2_1 = \frac{(B-E)^2}{E} = 10,701$$

$$p = 0,001 \text{ (signifikant)}$$

24 Stunden Granulopoese

	B _m	B _{nm}	B _{m+nm}	E _m	E _{nm}
Kontrolle	51	4038	4089	31	4058
Zusatz	6	3411	3417	25	3392
Summe	57		7506		

$$\chi^2_1 = \frac{(B-E)^2}{E} = 27,547$$

$$p = < 10^{-6} \text{ (signifikant)}$$

Tabelle 9b: Signifikanzberechnung der Mitosen

48 Stunden Erythropoese
(nach Yates'scher Korrektur)

	B _m	B _k	B _{nm}	B _{m+nm}	E _m	E _{nm}
Kontrolle	5	4,5	735,5	740	3,9	736,1
Zusatz	1	1,5	385,5	387	2,1	384,9
Summe	6			1127		

$$\chi^2_1 = \frac{(B_k - E)^2}{E} = 0,26515$$

$$p = 0,6 \text{ (nicht signifikant)}$$

48 Stunden Granulopoese

	B _m	B _{nm}	B _{m+nm}	E _m	E _{nm}
Kontrolle	32	3888	3920	18	3902
Zusatz	3	3395	3398	16	3382
Summe	35		7318		

$$\chi^2_1 = \frac{(B - E)^2}{E} = 21,545$$

$$p = < 10^{-5} \text{ (signifikant)}$$

In einem zusätzlichen Diagramm werden alle aus-
gezählten Zellen der fünf einzelnen Versuche zusammen-
gefaßt und die Kontrollauszählungen den Zusatzpräpa-
raten gegenübergestellt. Hierbei werden die verschie-
denen Grundkrankheiten nicht berücksichtigt, und
auch die Konzentrationsunterschiede des zugesetzten
Hydroxyurea werden vernachlässigt. Auf die Aufstel-
lung der 12 Stunden-Zählung wird verzichtet, weil
sie bekannterweise nur drei Versuchsreihen umfaßt.
Die 96 Stunden-Auswertung des Falles V wird in die
72 Stunden-Zählung übernommen. Die Mitoseindices und
die G/E-Indices werden ebenfalls aus den Gesamtzäh-
lungen ermittelt. Sie sind im graphischen Bild ein-
getragen (Abb. 6a und 6b).

Aus den Werten der Mitoseindices erkennt man bei den
Erythroblasten und Granuloblasten eine starke Hem-
mung der Regenerationsfähigkeit des Knochenmarks.
Diese Fähigkeit ist in beiden Reihen nach 72 Stunden
Kultivierungszeit mit dem Zusatzpräparat Hydroxyurea
vollständig blockiert.

Die errechneten Werte für die G/E-Indices sind für
Kontroll- und Zusatzauszählung in ihrer Größenord-
nung sehr konstant. Nur der 72 Stunden-Wert ist
bei der Zusatzkultur niedriger, d.h., es sind jetzt
relativ etwas mehr Erythroblasten, jedoch nach der Rei-
fungskurve vorwiegend (90 %) reife Erythroblasten
vorhanden.

Aus den gemittelten Reifungskurven der Erythropoese
(Abb. 6a) ergibt sich folgendes Bild: Nach 24 und

nach 48 Stunden tritt eine deutliche Beschleunigung der Zellausreifung ein. Nach 72 Stunden werden für die einzelnen Zelltypen die Kontrollwerte wieder erreicht. Proerythroblasten werden zu diesem Zeitpunkt nicht mehr beobachtet.

Die gemittelten Reifungskurven der Granulopoese (Abb. 6b) zeigen eine Linksverschiebung aller unreifen Zellen und eine geringe Beschleunigung der Zellausreifung mit Vermehrung der segmentkernigen Granulocyten. Allerdings könnte diese Linksverschiebung auch eine Verminderung teilungsfähiger Zellen bedeuten. Während die unreifen Granuloblasten sich auch hier nach 72 Stunden ihren Kontrollwerten wieder nähern, bleibt für die ausgereiften Zellen nach dieser Zeit eine Linksverschiebung bestehen. In der zusammenfassenden Graphik kann man im grundsätzlichen die Tendenzen der vorher einzeln bewerteten Fälle wiedererkennen.

Erythropoese

Mittelwerte aller fünf Versuche

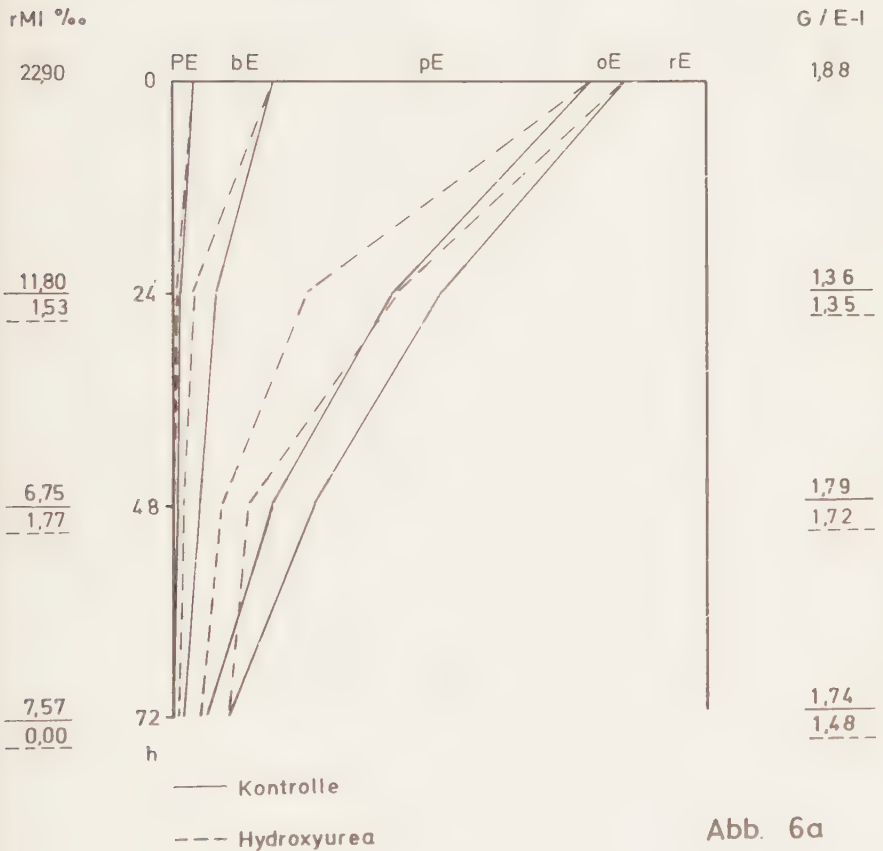


Abb. 6a

Granulopoese

Mittelwerte aller fünf Versuche

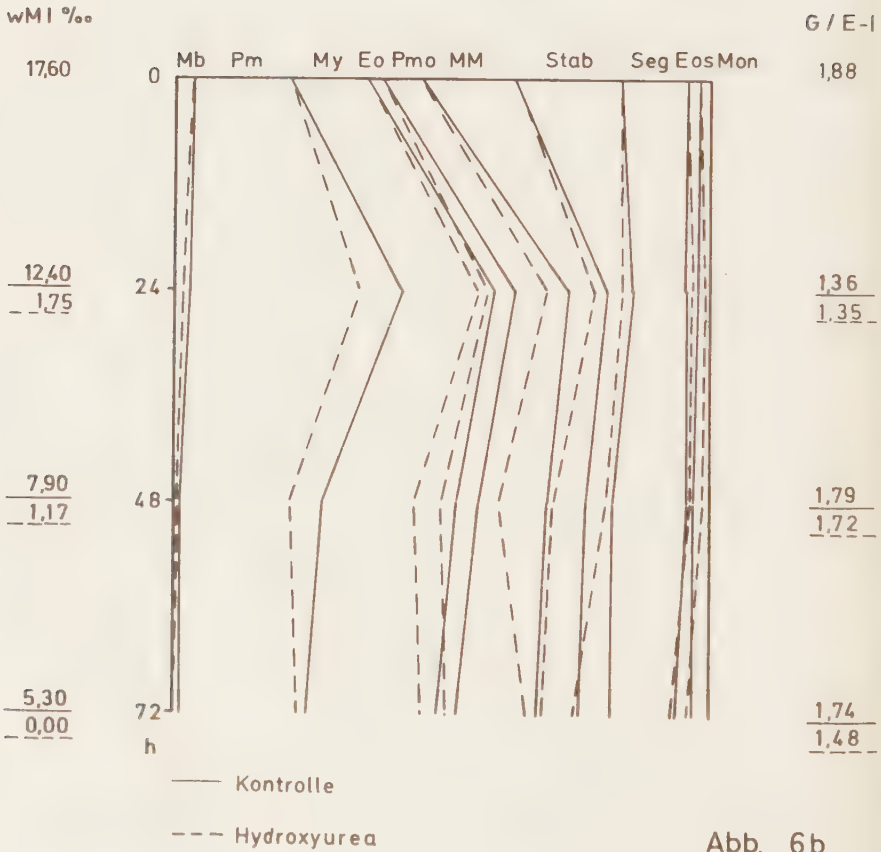


Abb. 6b

Beurteilung der karyologischen Kurven

Bei der Auswertung der karyologischen Kurven werden für die Erythropoese und für die Granulopoese drei verschiedene Zählungen zu Grunde gelegt (Abb. 7a und 7b, Tabelle 10). In das graphische Bild wird zusätzlich die prozentuale Verteilung der gezählten Mitosen bei den Kontrollkulturen mit den Erstausstichen eingezeichnet, obwohl diese Kurve den Zusatzkulturen nicht gegenübergestellt werden kann. Man vergleicht die gezählten Mitosen der Kontrollreihen ohne Originalausstriche mit den Ergebnissen aus den Hydroxyurea-kulturen.

Unter Einfluß des Zusatzes von Hydroxyurea erfahren beide Kurven der roten und der weißen Reihe Veränderungen. In der Erythropoese (Abb. 7a) liegt der Kurvengipfel stark ausgeprägt bei der frühen Metaphase, die Kurve fällt danach steil ab und erreicht den ersten Nullpunkt in der Anaphase. Nach einem erneuten Anstieg der Kurve (lediglich eine beobachtete Mitosephase) in der Telophase sind in der Rekonstruktionsphase wiederum keine Mitosen zu finden.

In der Granulopoese (Abb. 7b) liegt ein Kurvengipfel in der späten Metaphase. Die Kurve fällt sodann über die Anaphase ab. Telo- und Rekonstruktionsphasen werden nicht beobachtet. Eine Signifikanzberechnung führt bei den insgesamt wenigen Mitosen zu keiner Aussage.

Erläuterungen zu den Abbildungen 7a und 7b

Es bedeuten:

P	=	Prophase
fM	=	frühe Metaphase
SM	=	späte Metaphase
A	=	Anaphase
T	=	Telophase
R	=	Rekonstruktionsphase

-.-.-.- Kontrollzählung mit Erstaussstrichen

_____ Kontrollzählung ohne Erstaussstriche

----- Zählung mit Hydroxyurea-Zusatz

Erythropoese

Mitosephasenverteilung

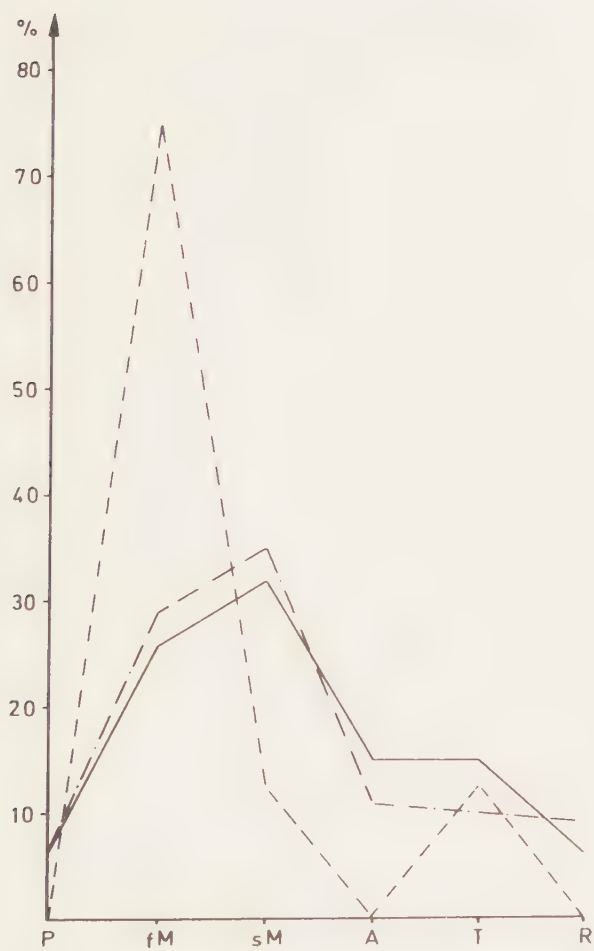


Abb. 7a

Granulopoese

Mitosephasenverteilung

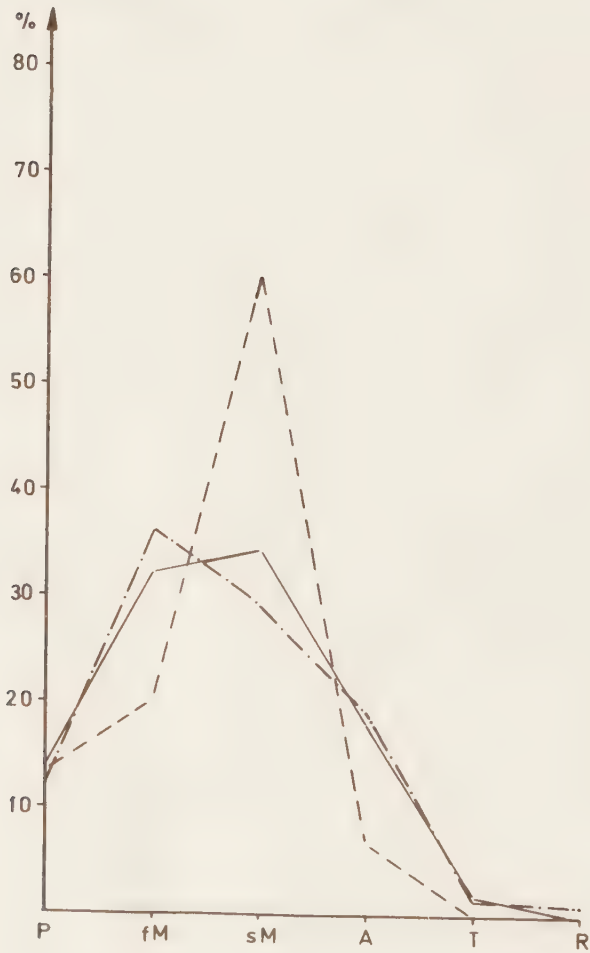


Abb. 7b

Tabelle 10: Verteilung der Mitosephasen von 354
gezählten Mitosen für die Erythropoese
und für die Granulopoese

Erythropoese	P	fM	sM	A	T	R	Summe
Kontrollen mit Erstaussstrichen	7	36	44	14	12	11	124
in %	5,6	29,0	35,5	11,3	9,8	8,8	100
Kontrollen ohne Erstaussstriche	3	14	17	8	8	3	53
in %	5,7	26,3	32,1	15,1	15,1	5,7	100
Hydroxyurea	0	6	1	0	1	0	8
in %	0,0	75,0	12,5	0,0	12,5	0,0	100

Granulopoese	P	fM	sM	A	T	R	Summe
Kontrollen mit Erstaussstrichen	26	74	61	39	5	2	207
in %	12,6	35,8	29,6	18,8	2,2	1,0	100
Kontrollen ohne Erstaussstriche	18	42	44	22	3	1	130
in %	13,9	32,3	33,8	16,9	2,3	0,8	100
Hydroxyurea	2	3	9	1	0	0	15
in %	13,3	20,0	60,0	6,7	0,0	0,0	100

Diskussion

An fünf Serien von Knochenmarkkulturen wird der direkte Einfluß von Hydroxyurea in zwei verschiedenen Konzentrationen auf die normale und leukämische Hämatopoese im Vergleich zu Kontrollkulturen untersucht.

Entsprechende Untersuchungen am menschliches Knochenmark scheinen bisher in der Literatur nicht vorzuliegen.

Hydroxyurea wird bei der Behandlung von Leukämien und malignen Neoplasmen angewandt (2, 10, 16, 20, 24, 25, 29, 34, 41). In dieser Hinsicht stellt sich die Frage, welchen Veränderungen die Hämatopoese eines Knochenmarks unterworfen wird, die sich uns im peripheren Blutbild als Leukopenie, Thrombozytopenie und Anämie darstellen. In unseren Untersuchungsreihen beträgt die Hydroxyureakonzentration für zwei Versuche 60 μ /ml und für drei Versuche 10 μ /ml. Diese Dosierungen wurden an die in der Literatur angegebenen Konzentrationen pro kg Körpergewicht angelehnt und entsprechen in ihrer Höhe den vielfältigen möglichen Dosierungsbreiten (16, 19).

Die Reifungskurven und G/E-Indices ermöglichen einen Aufschluß über die Reifung der Knochenmarkzellen,

während uns die Mitoseindices und karyologischen Kurven eine Beurteilung der Regenerationsfähigkeit geben. Wir vergleichen die Proliferationsaktivität der Knochenmarkkulturen unter Hydroxyureazusatz mit den Kontrollkulturen und berücksichtigen dabei die Konzentrationsunterschiede des zugesetzten Hydroxyurea, aber auch die Verschiedenheit des Zellmaterials, bei dem es sich in drei Fällen um normales und in zwei Fällen um leukämisches Knochenmark handelt.

Bei den leukämischen Knochenmarkproben handelt es sich um myeloische Leukämien mit erhöhtem Erythroblastenanteil, um sogenannte Erythroleukämien. Dementsprechend finden wir in der Erythropoese und in der Granulopoese ohne Hydroxyurea übereinstimmende Charakteristika im Verlauf der Reifungskurven (Abb. 1a, 1b, 2a, 2b).

In der roten Reihe dieser Erythroleukämien überwiegt im Erstaussstrich der Anteil der unreifen Erythroblasten, der relative Anteil der reifen Zellen ist noch gering. Im weiteren Verlauf der Kultivierungszeit nimmt der Anteil der unreifen Erythroblasten fast kontinuierlich ab und beträgt nach 72 Stunden in beiden Versuchsreihen weniger als 10 %.

Die drei Versuchsreihen mit nicht leukämischen, also normalen menschlichen Knochenmarkzellen, zeigen in der Erythropoese ohne Hydroxyurea-Zusatz einen ähnlichen Verlauf (Abb. 3a, 4a, 5).

In der Differenzierung ist lediglich der relative Anteil der orthochromatischen Erythroblasten geringer. Die Bezeichnung normal dient der Unterscheidung zu dem leukämischen Knochenmark, obwohl diese Knochenmarkzellen ebenfalls von kranken Patienten stammen.

In der Granulopoese weisen die Knochenmarkausstriche aller Versuchsreihen (Abb. 1b, 2b, 3b, 4b, 5) nach 24 Stunden Kontrollkultur übereinstimmend eine Vermehrung der teilungsfähigen Granuloblasten auf. BOLL führt diesen Effekt auf eine Stimulierung der Regeneration durch die Kulturbedingungen aufgrund einer wachstums- und mitoseanregenden Wirkung des Corhormons auf die Koagulumkultur zurück (5).

Unter Einwirkung von Hydroxyurea von 10 μ /ml Konzentrationsstärke auf die teilungsfähigen Zellen sowohl der Erythropoese als auch der Granulopoese finden wir eine deutliche Hemmung der Regeneration bei den leukämischen Knochenmarkzellen.

Eine Verminderung der teilungsfähigen Zellen bei der Erythropoese und bei der Granulopoese ist eine Bestätigung für den Verlust der Regenerationsfähigkeit der Zellen. Bei Hydroxyurea-Zusatz werden in der weißen und in der roten Reihe keine Mitosen beobachtet.

Es liegt eine vollständige Blockierung der Regeneration der leukämischen Zellen vor (Tab. 7, 8). Die Abnahme der Mitosehäufigkeit wurde für den 24 und 48 Stunden-Zeitpunkt berechnet und ist statistisch signifikant (Tab. 9a, 9b).

Bei den drei Knochenmarkproben mit nicht leukämischen Knochenmarkzellen wurden zwei Versuchsreihen mit einer Hydroxyurea-Endkonzentration von 60 μ /ml und eine Versuchsreihe mit 10 μ /ml ausgewertet. Einen dosisabhängigen Effekt des Hydroxyurea kann man bei dieser Versuchsserie nicht interpretieren. Die Herabsetzung der Konzentrationsstärke von Hydroxyurea wurde wegen des eindeutigen Effektes von 60 μ /ml auf die Regeneration durchgeführt. Sie wurde beibehalten, nachdem der Effekt auch bei 10 μ /ml erkennbar war.

Die Regenerationsfähigkeit der Knochenmarkzellen ist durch die Einwirkung von Hydroxyurea für die normale Hämatopoese (Versuchsreihen III, IV und V) stark beeinträchtigt und zum Teil in der Erythropoese vollständig aufgehoben. Bei den wenigen beobachteten Mitosen handelt es sich im wesentlichen um frühe und späte Metaphasen, die vermutlich in ihrem Ablauf noch blockiert sind (Tab. 7, 8; Abb. 7).

Die Abnahme der Mitosetätigkeit wurde für 24 und 48 Stunden berechnet und ist statistisch signifikant (Tab. 9a, 9b).

Die durch diese Untersuchung nachgewiesene Blockierung bzw. Abnahme der Mitose-tätigkeit der Knochenmarkzellen bestätigt Ergebnisse von Untersuchungen anderer Autoren, die ebenfalls eine durch Hydroxyurea bewirkte Abnahme der Mitoseindices erkannt haben. Als Untersuchungsmaterial dienten ihnen jedoch entweder Knochenmarkzellen von Ratten oder Gewebezellen aus Tumoren (22, 31, 32, 36).

Die Wirkung von Hydroxyurea auf die normale und leukämische Haematopoese manifestiert sich in den Reifungskurven aller Versuchsserien durch eine Linksverschiebung. Eine durchgeführte Berechnung der Ergebnisse zeigt für alle Zeitpunkte Signifikanz. (Tab. 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4b, 5a, 5b).

Dies kann der Ausdruck einer Beschleunigung der Zellausreifung sein oder der fehlenden Vermehrung teilungsfähiger Zellen.

Bei Miteinbeziehung der G/E-Indices (Tab. 6) in diese Betrachtung ist nicht auszuschließen, daß es sich bei der Linksverschiebung der Reifungskurven nicht um eine beschleunigte Zellausreifung handelt, sondern Hydroxyurea einen letalen Faktor für die teilungsfähigen Erythroblasten und auch Granuloblasten darstellt. Nach BOHNE bewirken nämlich hohe Dosen von Hydroxyurea eine Zerstörung aller proliferierenden Zellen des Knochenmarks. Aber nur die, die sich in der praesynthetischen G_1 -Phase befinden, werden gehindert,

in die S-Phase überzuwechseln (4). Auch nach RAJEWSKY können die blockierten Zellen durch Hydroxyurea für die Dauer des Blockes nicht nur in der S-Phase arretiert, sondern infolge cytotoxischer Effekte des Inhibitors auch abgetötet, d.h., aus der proliferierenden Fraktion der Population eliminiert werden (32).

Zusammenfassung

Hydroxyurea wird therapeutisch überwiegend bei malignen Systemerkrankungen und Tumoren angewandt und erzwingt durch das dabei verursachte Auftreten von starken Myelodepressionen oft eine Unterbrechung der Behandlung. In der dargestellten Untersuchung wurde die direkte Einwirkung von Hydroxyurea auf die Proliferation von normalen und leukämischen menschlichen Knochenmarkszellen *in vitro* untersucht.

In von Boll entwickelten Koagulumkulturen mit spezieller Auswertung wurde das Knochenmark von fünf Patienten mit Hydroxyurea bebrütet. Es wurden zwei leukämische und drei normale Knochenmarkproben ausgewertet. Die Konzentration des zugesetzten Hydroxyurea betrug bei den Leukämien 10 μ /ml und beim normalen Knochenmark für zwei Kulturen 60 μ /ml und für eine Kultur 10 μ /ml.

Aus Differentialzählungen nach 0, 12, 24, 48 und 72 Stunden Kultivierzeit wurden Reifungs- und karyologische Kurven sowie Mitose- und G/E-Indices mit den Kontrollkulturen verglichen.

Die Beeinflussung der Regeneration ist durch beide Dosierungen stark, d.h., nach den Mitoseindices

werden Mitosen signifikant vermindert, nach den karyologischen Kurven auch noch blockiert.

Die Wirkung von Hydroxyurea auf die Reifungskurven der Erythropoese und der Granulopoese von normalem und leukämischem Knochenmark besteht in einer ausgeprägten Linksverschiebung der Reifungskurven.

Eine signifikante Beschleunigung der Zellausreifung oder entsprechend der vollständig fehlenden oder teilweisen gehemmten Regeneration vorhandene Abnahme der teilungsfähigen Vorstufen in beiden Zellreihen werden diskutiert. Die Erythropoese und die Granulopoese des normalen und des leukämischen Knochenmarks sind, nach den G/E-Indices zu beurteilen, gleichermaßen betroffen.

Literaturverzeichnis

- (1) ADAMS, R.L.P., LINDSAY, J.G.: Hydroxyurea-reversal of inhibition and use as a all-synchronizing agent.
J. Biol. Chem. 242 (1967) 1314
- (2) ARIEL, J.M.: Therapeutic effects of hydroxyurea.
Canc. Res. 25 (1970) 705
- (3) BELITZ, H.-J.: Die Anwendung statistischer Methoden in der Biologie.
in "Der Mathematikunterricht"
Heft 3/60 Klett-Verlag, Stuttg. 1960
- (4) BOHNE, F., HAAS, R.J., FLIEDNER, T.M., FACHE, I.:
The Role of Slowly Proliferating Cells in Rat Bone Marrow during Regeneration following Hydroxyurea.
Brit. J. Haematol. 19 (1970) 533
- (5) BOLL, I.: Granulocytopoese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.
Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New-York 1966
- (6) BOLL, I.: Die Proliferationskinetik der normalen und leukämischen Granulopoese.
Fol. haemat. N.F. 91 (1969) 172
- (7) BOLL, I.: Morphologische Studien zum Verhalten von Knochenmarkzellen in vitro-Granuloblastenmitosen.
Fol. haemat. N.F. 3 (1959) 78
- (8) BOLL, I., MERSCH, G.: Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Erythropoese in vitro.
Blut 17 (1968) 193

- (9) BRUNNER, K.W.: Grundsätze der chemotherapeutischen Behandlung der Krebserkrankheiten.
Schweiz. med. Wschr. 95 (1965) 789
- (10) CASSILETH, P.A. and HYMAN, G.A.: Treatment of Malignant Melanoma with Hydroxyurea.
Canc. Res. 27 (1967) 1843
- (11) COLVIN, M. and BONO, Jr. V. H.: The Enzymatic Reduction of Hydroxyurea to Urea by Mouse Liver.
Canc. Res. 30 (1970) 1516
- (12) DENNIS, L.H.: Chemotherapy of Hematologic Malignancies during pregnancy.
Canc. Chemotherapy, Basic and Clinical Applications. Grune and Stratton, New-York-London 1967
- (13) DRESLER, W.F.C., STEIN, R.: Über den Hydroxylharnstoff.
Justus Liebigs Ann. Chem. 150 (1869) 242
- (14) EHRHART, G., RUSCHING, H.: Arzneimittel, Entwicklung, Wirkung, Darstellung.
Chemotherapeutica Bd. 5, Teil 2 (1972)
- (15) FARBER, E., BASERGA, R.: Differential Effects of Hydroxyurea on Survival of Proliferating Cells.
Canc. Res. 29 (1969) 136
- (16) FISHBEIN, W.N., CARBONE, P.P., et al.: Clinical trials of Hydroxyurea in patients with cancer and leukemia.
Clin. Pharmacol. Ther. 5 (1964) 574

- (17) HAMBSCH, K. und KLUGMANN, H-J.: Klinische Onkologie.
Gustav Fischer Verlag, Stuttg. 1971
- (18) HELWIG, B.: Moderne Arzneimittel. Eine Spezialitätenkunde nach Indikationsgebieten für Ärzte und Apotheker.
Wissensch. Verlagsges. Stuttg. 1969
- (19) KENNEDY, B.J.: Hydroxyurea Therapy in Chronic Myelogenous Leukemia.
Canc. Res. 29 (1972) 1052
- (20) KENNEDY, B.J. and YARBRO, J.W.: Metabolic and therapeutic effects of Hydroxyurea in chronic myeloid leukemia.
J. Am. med. Ass. 195 (1966) 1038
- (21) KRAKOFF, J.H., BROWN, N.C., REICHARD, P.: Inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by Hydroxyurea.
Canc. Res. 28 (1968) 1559
- (22) KUMMERMEHR, J., TROTT, K.-R.: Strahlenwirkung auf ein transplantables Fibrosarkom der C3H-Maus nach Teilsynchronisation mit Hydroxyharnstoff.
Aktuelle Probleme. Wüst 19, 274
- (23) LANGEN, P.: Antimetabolite des Nukleinsäure-Stoffwechsels. Biochemische Grundlagen der Wirkung.
Akademie Verlag Berlin 1968
- (24) LERNER, H.J., BECKLOFF, G.: Hydroxyurea administered intermittently.
J. Am. med. Ass. 192 (1965) 1168

- (25) LERNER, H.J. and BECKLOFF, G.L.: Combined Chemotherapy and Radiotherapy. Preliminary Results of Hydroxyurea and x-irradiation in the Treatment of Epidermoid Cancers of the Head and Neck.
Am. Surg. 33 (1967) 165
- (26) LEXIKON chemischer Kurzbezeichnungen von Arzneistoffen. Arzneibüro der ABDA. Govi-Verlag, Frankfurt 1968
- (27) MARTINDALE: The Extra Pharmacopoeia.
26th Edition (1973)
The pharmaceutical Press London.
- (28) NEVINNY, H.B. and HALL, T.C.: Some aspects of the antitumor activity and Pharmacology of Hydroxyurea.
J. clin. Pharmac. 8 (1968) 352
- (29) NEYWER, M.: Organisch-chemische Arzneimittel und ihre Synonyma.
Akademie-Verlag Berlin 1971
- (30) PATAU: χ^2 -Tafeln
Zeitschrift für Vererbungslehre
80 (1940) 558.
- (31) PHILIPS, F.S., STERNBERG, S.S., SCHWARTZ, H.S., CRONIN, A.P., SODERGREN, J.E., VIDAL, P.M.:
Hydroxyurea. Acute Cell Death in Proliferating Tissues of Rats.
Canc. Res. 27 (1967) 61
- (32) RAJEWSKY, M.F.: Synchronisation in vivo: Kinetics of a malignant cell system following temporary inhibition of DNA synthesis with hydroxyurea.
Exptl. Cell Res. 60. (1970) 269

- (33) RAJEWSKY, M.F., HOLSER, D.F., FABRICIUS, E.:
Untersuchungen zur Synchronisation
in vivo: Temporäre Inhibition der
DNA-Synthese durch Hydroxyharn-
stoff in normalem und malignem
Säugerzellsystemen.
Z. Krebsforschung 76 (1971) 266
- (34) RICHARDS, G.J. and CHAMBERS, R.G.: Therapeutic
Effects of Hydroxyurea.
J. Am. med. Ass. 208 (1969) 1055
- (35) ROSENKRANZ, H.S., JACOBS, S.J.: Inhibition of DNA
synthesis by Hydroxyurea.
Gann. Monograph 6 (1968) 15
- (36) SCHWARZENBERG, L., MATHÉ, G., POUILLART, P., et al:
Hydroxyurea, Leucopheresis, and
Splenectomy in Chronic Myeloid
Leukaemia at the Problastic Phase.
Brit. Medic. Journal 1 (1973) 700
- (37) SCHWARZENBERG, L.: White Blood cell Transfusions.
Israel Journal of Medical
Science 1 (1965) 925
- (38) SCHWARTZ, H.S., GAROFALO, M., STERNBERG, S.S.,
PHILIPS, F.S.: Hydroxyurea: Inhibition of
Desoxyribonucleic Acid Synthesis
in Regenerating Liver of Rats.
Canc. Res. 25 (1965) 1867
- (39) THE MERCK INDEX: Eighth Edition.
- (40) VESCO, C., PEUMAN, S.: Purified cytoplasmic DNA
from Hela cells: Resistance to
inhibition by Hydroxyurea.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 35
(1969) 249

- (41) WEIL, M. and TANZER, J., et al.: Hydroxyurea in
the treatment of chronic myeloid
leukemia.
Pres. Med. 74 (1966) 2929

- (42) WILMANNS, W.: Antimetabolite.
Internist 12 (1971) 127 1. Zusatzheft

- (43) YARBRO, J.W.: Hydroxyurea in the Treatment of
Refractory Psoriasis.
The Lancet II, 2(1969) 846

- (44) YARBRO, J.W.: Further Studies on the Mechanism
of Action of Hydroxyurea.
Can. Res. 28 (1968) 1082

- (45) YOUNG, C.W., SCHOCHETMAN, G., and KARNOFSKY, D.A.:
Hydroxyurea-induced inhibition of
deoxyribonucleotide synthesis.
Studies in intact cells.
Canc. Res. 27 (1967) 526

- (46) YOUNG, C.W., HODAS, S.: Hydroxyurea: Inhibitory
effects of DNA metabolism.
Science 146 (1964) 1172

Lebenslauf

Ich wurde am 3. Februar 1944 in Meppen/Ems, wohin meine Mutter nach totalem Bombenschaden in Berlin Ende 1943 vorübergehend übergesiedelt war, als Sohn des Dr. jur. Gerold Nachtweh und seiner Ehefrau Valentina, geb. Merkner, geboren. Im Herbst 1949 wurde ich in Berlin-Wilmersdorf in die erste Klasse der Einheitsschule von Groß-Berlin eingeschult. Da mein Vater nach dem Ende des zweiten Weltkrieges, an dem er als Wehrmachtsangehöriger teilgenommen hatte, in Dortmund eine Tätigkeit als Staatsanwalt gefunden hatte, folgte ihm meine Mutter im August 1950 dorthin. In Dortmund mußte ich wegen des zu Ostern liegenden Schuljahrsbeginns nochmals in die erste Volksschulklasse eintreten. Ich fand Aufnahme in der Volksschule Semerteich in Dortmund-Hörde. Ab Ostern 1954 besuchte ich das Humboldt-Gymnasium in Dortmund, an dem ich im Februar 1963 die Reifeprüfung ablegte. Im Sommer-Semester 1963 nahm ich an der Universität Münster das Studium der Zahnheilkunde auf. Nach bestandenenem Physikum setzte ich mein Studium im Sommer-Semester 1966 an der Freien Universität Berlin fort. Im Sommer-Semester 1968 legte ich dort im Fach Zahnheilkunde das Staatsexamen ab. Am 11.3.1969 wurde mir die Bestallung zum Zahnarzt erteilt. Zur Zeit arbeite ich in einer Zahnarztpraxis in Berlin-Charlottenburg.

